

# **EXTRAZELLULÄRES ATP SCHÜTZT VOR DEM AKUTEN ENDOTHELIALEN REPERFUSIONSSCHADEN**

**SASCHA ANDREAS KASSECKERT**

**INAUGURALDISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES  
DOKTORS DER MEDIZIN  
DES FACHBEREICHES HUMANMEDIZIN DER  
JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

# **EXTRAZELLULÄRES ATP SCHÜTZT VOR DEM AKUTEN ENDOTHELIALEN REPERFUSIONSSCHADEN**

## **INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**SASCHA ANDREAS KASSECKERT**

Gießen (2005)

Aus dem Physiologischen Institut  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. M. Piper  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

Gutachter: Prof. Dr. R. Voss

Tag der Disputation: 26. Januar 2006

*Für meine Mutter*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Auswirkungen kardialer Ischämie und Reperfusion auf mikrovaskuläre Endothelzellen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Charakterisierung der Endothelfunktion	1
1.1.2	Charakterisierung von Ischämie und Reperfusion	2
1.1.3	Die Rolle des endothelialen kontraktiven Apparates während Ischämie und Reperfusion	3
<b>1.2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Verwendete Modelle</b>	<b>6</b>
1.3.1	Simulierte Ischämie und Reperfusion an endothelialen Monolayern	6
1.3.2	Ischämie und Reperfusion am intakten Koronarsystem	6
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Häufig verwendete Puffer und Medien</b>	<b>9</b>
2.2.1	Zellkulturmedien	9
2.2.2	Perfusionsmedien	10
2.2.3	Elektrophorese-Medien	11
<b>2.3</b>	<b>Geräte und Laborbedarf</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN UND PROTOKOLLE</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuche zur Simulation von Ischämie und Reperfusion an koronarvaskulären Endothelzellmonolayern</b>	<b>16</b>
3.1.1	Versuchstiere	16

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.2	Präparation von mikrovaskulären koronaren Endothelzellen adulter Ratten	16
3.1.3	Zellkultur	17
3.1.4	Experimente	18
3.1.4.1	Apparative Vorraussetzungen	18
3.1.4.2	Protokolle	19
3.1.4.3	Messparameter	20
3.1.5	Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von $\text{Ca}^{2+}$	21
3.1.6	Bestimmung der Größe der Interzellularspaltenbildung	22
3.1.7	Bestimmung der Myosinleichtkettenphosphorylierung	24
<b>3.2</b>	<b>Versuche zu Ischämie und Reperfusion an isolierten Herzen</b>	<b>26</b>
3.2.1	Versuchstiere	26
3.2.2	Präparation der Herzen	27
3.2.3	Experimente	27
3.2.3.1	Apparative Vorraussetzungen	27
3.2.3.2	Experimentelle Protokolle	28
3.2.3.3	Messparameter	29
3.2.4	Ermittlung des kardialen Ödems	29
<b>3.3</b>	<b>Statistik</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Simulierte Ischämie und Reperfusion an endothelialen Monolayern</b>	<b>31</b>
4.1.1	Auswirkungen von Hypoxie und Reoxygenierung auf die zytosolische $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration und die interzelluläre Lückenbildung	31



# Inhaltsverzeichnis

---

4.1.2	Wirkung von extrazellulärem ATP auf Koronarendothelien unter simulierten Ischämie-Reperfusionsbedingungen	34
4.1.3	Einfluß der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration auf die Wirkung von extrazellulärem ATP	36
4.1.4	Die Rolle der MLK-Phosphorylierung beim ATP-vermittelten Schutz vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung	39
4.1.5	Effektvermittlung bei extrazellulärer ATP-Applikation	41
4.1.6	Reversibilität des ATP-Effektes	43
<b>4.2</b>	<b>Ischämie-Reperfusionsversuche am isolierten Herz</b>	<b>46</b>
4.2.1	Die Wirkung von ATP auf die reperfusionsinduzierte Ödementwicklung in isolierten Herzen	47
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Endotheliale Monolayer unter simulierten Ischämie-Reperfusionsbedingungen</b>	<b>50</b>
5.2.1	Charakterisierung der Calciumüberladung in Endothelzellen unter simulierten Ischämie- und Reperfusionsbedingungen	50
5.2.2	Charakterisierung der interzellulären Lückenbildung in Endothelzellmonolayern bei simulierter Ischämie und Reperfusion	51
<b>5.3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>52</b>
5.3.1	Die Wirkungen von extrazellulärem ATP auf Endothelzellen	52
5.3.2	Reversibilität der ATP-Effekte	54
5.3.3	Der ATP-Metabolit Adenosin und sein Einfluß auf die beobachteten Effekte in den untersuchten Modellen	54
<b>5.4</b>	<b>Simulierte Ischämie und Reperfusion am intakten Koronarsystem</b>	<b>55</b>
<b>5.5</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>56</b>

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>69</b>

## ABKÜRZUNGEN

8-PT	8-Phenyltheophyllin
A	Ampère
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cm	Zentimeter
DTT	1,4-Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(-aminoethylether-)tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
Fura-2	1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(-2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
x g	x Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
i. E.	internationale Einheiten
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
JLU	Justus-Liebig-Universität
kg	Kilogramm
M	Mol / Liter
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm

## Abkürzungen

---

min	Minuten
ml	Milliliter
MLK	Myosinleichtketten
MLK~P	monophosphorylierte MLK
MLK~PP	diphosphorylierte MLK
MLKK	MLK-Kinase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCS	Neonatales Kälberserum
p	Signifikanzniveau
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
s	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	zytosolische freie Calciumionenkonzentration
% (vol / vol)	Volumenprozent
% (wt / vol)	Gewichtsprozent

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Auswirkungen kardialer Ischämie und Reperfusion auf mikrovaskuläre Endothelzellen**

### **1.1.1 Charakterisierung der Endothelfunktion**

Das Endothel trennt als einlagige, kontinuierliche Zellschicht an der Innenwand der Gefäße das intravasale vom interstitiellen Kompartiment. Es kann aufgrund seiner Oberfläche ( $10.000 \text{ m}^2$ ), seiner Zellzahl ( $6 \times 10^{13}$ ) und seiner Masse (1,5 kg) als eigenständiges Organ betrachtet werden. Lange wurde dem Endothel nur die Rolle einer passiven Barriere zwischen Blut und Extravasalraum zugeschrieben. Erst mit der Entdeckung des Prostacyclins und anderer endothelialer Prostanoiden begann man zu registrieren, dass das Endothel über autokrine, epikrine und parakrine Signalwege die Kommunikation zwischen Intravasalraum, Gefäßwand und Gewebe ermöglicht und damit lebenswichtige homöostatische Funktionen übernimmt. Durch die Bildung und Metabolisierung einer Vielzahl vasoaktiver Substanzen kontrolliert das Endothel den lokalen Gefäßtonus und damit Durchblutung und Kreislauf, wirkt auf Thrombozyten und Makrophagen in der Strombahn und ist damit an der Entstehung von Entzündungsreaktionen und der Hämostase beteiligt (Bassenge 1990, Newby et al. 1990, Busse et al. 1993, Busse et al. 1995, Davies et al. 1995, Fleming et al. 1996).

Diese Funktionen werden während Ischämie und Reperfusion gestört. Bei Endothelzellen ist dies insbesondere durch Verlust der endothelialen Schrankenfunktion, Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO und dem Entstehen inflammatorischer Prozesse gekennzeichnet (Inauen et al. 1990, Kupatt et al. 1997). Durch den Verlust der endothelialen Schrankenfunktion kommt es im koronaren mikrovaskulären Strombett zu einer Permeabilitätssteigerung, die bei der Pathogenese des kardialen Oedems eine zentrale Rolle spielt. Dieser Vorgang wird in der Transplantationsmedizin beobachtet und ist vielfach am isolierten Herzen untersucht worden (Apstein et al. 1977, al-Haboubi et al. 1995, Dagenais et al. 1997, Di Napoli et al. 2001). In früheren Arbeiten an

Endothelzellmonolayern wurde gezeigt, dass es im Zuge der Reperfusion nach simulierter Ischämie zu einer Störung der endothelialen Schrankenfunktion kommt, was sich im Monolayer durch die Ausbildung interzellulärer Lücken zeigt (Schäfer et al. 2003). Endothelzellen spielen somit eine wichtige Rolle bei ischämie- und reperfusionsinduzierten Organschäden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der reperfusionsinduzierten Störung der endothelialen Schrankenfunktion. Um die Veränderungen des Endothels während der Reperfusion unabhängig von extrinsischen Faktoren charakterisieren zu können, wurden zunächst kultivierte koronare Endothelzellmonolayer unter simulierten Ischämie-Reperfusionsbedingungen untersucht. Um zu überprüfen wie weit die dabei gewonnenen Erkenntnisse auf das intakte Koronarsystem übertragbar sind, wurden weitere Versuche an isolierten Herzen durchgeführt.

### **1.1.2 Charakterisierung von Ischämie und Reperfusion**

Ischämie führt zur Minderversorgung des betroffenen Organs mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die gespeicherten Energieträger, unter anderem ATP, werden abgebaut und die Stoffwechselmetabolite akkumulieren.

Die Endothelzelle kann zur Energiegewinnung zum einen die oxidative Phosphorylierung und zum anderen die Glykolyse nutzen. Wenn aufgrund eines O<sub>2</sub>-Mangels die mitochondriale Atmung ausfällt, wird der Energiebedarf zunächst anaerob über den glykolytischen Abbau von Glucose gedeckt. Die anoxische Unterbrechung des Citratzyklus führt zur Akkumulation von Laktat und zum Abbau von ATP. Durch die fortschreitende Azidifizierung wird das Schrittmacherenzym der Glykolyse, die Phosphofruktokinase, und somit auch der anaerobe Weg der ATP-Produktion gehemmt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Endothelzellen sehr empfindlich auf eine Absenkung des cytosolischen ATP-Gehaltes reagieren (Watanabe et al. 1991, Noll et al. 1995, Muhs et al. 1997). Bei metabolischer Inhibierung führt bereits eine Erniedrigung der intrazellulären ATP-Konzentration um weniger als 30% in Endothelzellen zu einem deutlichen Calciumanstieg (Noll et al. 1995, Schäfer et al. 2001). Dieser Anstieg, der auch

bei hypoxisch bedingtem Energiemangel zu beobachten ist, ist zweiphasig. Der initiale, transiente Anstieg wird durch eine Aktivierung der  $IP_3$  - abhängigen  $Ca^{2+}$  - Freisetzung - Kanäle des endoplasmatischen Retikulums (ER) hervorgerufen. Die Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher triggert einen progredienten kapazitativen Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Medium (Putney 1990, Dolor et al. 1992, Schäfer et al. 2001). Verlauf und Ausprägung dieses Calciumanstiegs werden vom extrazellulären pH-Wert und der Aktivität verschiedener Calciumpumpen und Kanäle, unter anderem der ER-assoziierten  $Ca^{2+}$ -ATPase, beeinflusst (Ladilov et al. 2000, Moccia et al. 2002).

Die cytosolische Calciumüberladung während Ischämie ist pathophysiologisch von Bedeutung, da durch diese eine Reihe strukturschädigender Mechanismen aktiviert werden, die eine dauerhafte Funktionseinschränkung zu Folge haben (Curry FE 1992, Furchgott et al. 1993). Einhergehend mit dieser Calciumüberladung ist in der Anoxie an Endothelzellmonolayern eine progrediente Zunahme der interzellulären Lücken, und damit der Permeabilität, zu beobachten.

In der Reperfusion kommt es zu einer Wiederversorgung des betroffenen Organs mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die in der Anoxie entstandenen Zellschäden sind in der frühen Phase dieser Reenergetisierung nicht reversibel. In früheren Arbeiten an Endothelzellen wurde gezeigt, dass es im Zuge der Reperfusion nach simulierter Ischämie zu einer weiteren Calciumüberladung und zu einer progredient verstärkten Zunahme interzellulärer Lücken kommt (Schäfer et al. 2003). Diese reperfusionsinduzierte Funktionsstörung und seine Beeinflussbarkeit standen im Focus der vorliegenden Arbeit.

### **1.1.3 Die Rolle des endothelialen kontraktilen Apparates während Ischämie und Reperfusion**

Endothelzellen enthalten einen kontraktilen Apparat, der an der reperfusionsinduzierten Lückenbildung massgeblich beteiligt ist (Schäfer et al. 2003). Die Aktivität des endothelialen kontraktilen Apparates wird, wie bei

Glattmuskelzellen, durch die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins kontrolliert (Schnittler et al. 1990, Wysolmerski et al. 1990, Sheldon et al. 1993, Goeckeler et al. 1995). Der Phosphorylierungsgrad der Myosinleichtketten wird durch phosphorylierende Enzyme, wie die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLKK), und dephosphoryliernde Enzyme, die Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1, PP2A), gegensätzlich beeinflusst. Bei Überwiegen der Phosphataseaktivität kommt es zu einer Dephosphorylierung der Myosinleichtketten und so zu einer Relaxation des kontraktile Apparates. Überwiegt die Aktivität der MLKK, führt dies zur Entstehung interzellulärer Lücken (Noll et al. 1995), und so zu einer erhöhten Permeabilität. Die Aktivität der MLKK wird durch Calcium/Calmodulin gesteigert und ist somit von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig (Garcia et al. 1997, Verin et al. 1998). Die Interzellularspaltenbildung kann durch Hemmstoffe der Aktin-Myosin-Interaktion, durch Hemmung der MLKK und durch PP1/2A-Aktivierung unterbunden werden (Sheldon et al. 1993, Noll et al. 1999, Watanabe et al. 1996, Schäfer et al. 2003). Der einzige zurzeit bekannte Aktivator der genannten endothelialen Proteinphosphatasen ist extrazelluläres ATP (Noll et al. 2000).

Der endotheliale kontraktile Apparat ist auch in der Reperfusion an der Entstehung von Interzellularspalten massgeblich beteiligt (Schäfer et al. 2003).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob die phosphatasenaktivierende Eigenschaft von extrazellulärem ATP zur Beeinflussung des reperfusionsinduzierten Barrierschadens genutzt werden kann.

Im ischämischen Myokard wird ATP zusammen mit Stoffwechselprodukten aus Endothelzellen freigesetzt und im Extrazellulärraum durch Ektoenzyme abgebaut (Pearson et al. 1980, Berra-Romani et al. 2004). Frühere Studien haben gezeigt, dass ATP nicht nur calciumunabhängig zu einer Dephosphorylierung der MLK führt und dadurch den kontraktile Apparat relaxiert (Noll et al. 2000), sondern dass es auch die thrombininduzierte, Rho-vermittelte Endothelzellkontraktion verhindern kann (Gündüz et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ATP sowohl die endotheliale Schrankenfunktion als auch die intrazelluläre Calciumhomöostase beeinflusst und dass diese ATP-Effekte durch



die auf Endothelzellen exprimierten P2X- und P2Y-Rezeptoren vermittelt werden (Motte et al. 1995, Noll et al. 1999, Yamamoto et al. 2000, Ramirez et al. 2002, Schwiebert et al. 2002, Tanaka et al. 2004). Ob extrazelluläres ATP den endothelialen kontraktilen Apparat auch in der Reperfusionsphase beeinflusst, war zuvor noch nicht untersucht worden.

## **1.2 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu zeigen,

- 1.) ob extrazelluläres ATP die reperfusionsinduzierte Lückenbildung in Endothelzellschichten und die reperfusionsinduzierte Ödementstehung in isoliert perfundierten Herzen reduzieren kann,
- 2.) ob eine Beeinflussung der reperfusionsinduzierten Lückenbildung durch extrazelluläres ATP von der intrazellulären Calciumhomöostase abhängig ist,
- 3.) ob die Zugabe von ATP den endothelialen kontraktilen Apparat durch Modulierung der MLK-Phosphorylierung beeinflusst und
- 4.) ob diese Effekte durch einen Abbau von ATP zu Adenosin und dadurch bedingte Eigeneffekte von Adenosin beeinflusst werden.

## **1.3 Verwendete Modelle**

### **1.3.1 Simulierte Ischämie und Reperfusion an endothelialen Monolayern**

An koronarendothelialen Monolayern wurden diese Ziele auf zellulärer Ebene, unabhängig von extrinsischen Faktoren, verfolgt. Um Ischämie- und Reperusionsbedingungen zu simulieren, wurden die Zellen anoxisch mit einem pH-Wert von 6,4 und in der Reoxygenation mit einem pH-Wert von 7,4 perfundiert. Eine intrazelluläre Azidifizierung, wie sie in vivo im ischämischen Gewebe auftritt, wurde so auch in vitro erreicht. An diesem Modell wurden die Veränderungen der intrazellulären Calciumhämöostase, der interzellulären Lückenbildung und der Myosinleichtkettenphosphorylierung während simulierter Ischämie und Reperfusion untersucht.

### **1.3.2 Ischämie und Reperfusion am intakten Koronarsystem**

An retrograd perfundierten isolierten Rattenherzen wurde untersucht, wie weit die an Endothelzellmonolayern erhobenen Befunde auf das intakte Koronarsystem übertragbar sind. Die Herzen wurden einer No-Flow-Ischämie ausgesetzt, anschließend reperfundiert und danach der Wassergehalt des Herzgewebes als Maß für die Gefäßpermeabilität bestimmt. Die Reperfusion wurde unter kardioplegischen Bedingungen durchgeführt, um Einflüsse von extrazellulärem ATP auf den Wassergehalt des Herzgewebes durch Beeinflussung von Kontraktilität und Schlagfrequenz auszuschliessen.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien

8-Phenyltheophyllin	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid PAGE 40%	Amersham Biosciences, Freiburg
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Anti - Mouse IgM - AP Conjugate	Sigma, Taufkirchen
ARL 67156	Sigma, Taufkirchen
ATP	Sigma, Taufkirchen
BAPTA	Sigma, Taufkirchen
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Benzonase Reinheitsgrad II	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Carbogen (O <sub>2</sub> 95 % / CO <sub>2</sub> 5 %)	Messer Griesheim, Krefeld
Collagenase; Typ CLS II, (322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Cystein	Sigma, Taufkirchen
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Merck, Darmstadt

EGTA	Sigma, Taufkirchen
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Fura-2 AM	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin 87%	Amersham Biosciences, Freiburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt
Ionomycin	Calbiochem, Bad Soden
Medium199 / Earl´s Salts	Invitrogen, Karlsruhe
Monoclonal Anti Myosin Light Chain (Klon My 21)	Sigma, Taufkirchen
N <sub>2</sub>	Messer Griesheim, Krefeld
N,N- Metylenbisacrylamid 2%	Amersham Biosciences, Freiburg
Nitro Blue Tetrazolium	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Resazurin	Sigma, Taufkirchen
Suramin	Tocris, Köln
Temed	Sigma, Taufkirchen
Thioglycolat	Sigma, Taufkirchen

Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton	AppliChem, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Urea	Merck, Darmstadt

Die übrigen verwendeten Chemikalien werden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien werden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

## 2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

### 2.2.1 Zellkulturmedien

#### Medium 199 / HEPES-Stammlösung:

Medium 199 / HEPES-Stammlösung	9,8 g / l
HEPES	36 g / l

#### Kultivierungsmedium:

Medium 199 / CO <sub>2</sub>	x ml
Mixed Serum (NCS / FCS = 1 / 1)	20 % (vol / vol)
Penicilin / Streptomycin	1. und 2. Tag 5 % (vol / vol)
	ab dem 3. Tag 2 % (vol / vol)

Beladungsmedium:

Medium 199 / HEPES Stammlösung 9,8 g / l

FCS 3 %

Alle Medien werden bei 4° C aufbewahrt.

**2.2.2 Perfusionsmedien**

Für unsere Untersuchungen werden verschiedene Perfusionsmedien benutzt, deren Zusammensetzung im Folgenden beschrieben wird.

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (140,0); KCl (2,6), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), MgSO<sub>4</sub> (1,2), CaCl<sub>2</sub> (1,3), HEPES (25,0); Glukose (5,0); pH-Wert 7,4 bei 30° C nach Titration mit NaOH.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (140,0), KCl (2,6), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), MgSO<sub>4</sub> (1,2), CaCl<sub>2</sub> (1,3), HEPES (25,0); pH-Wert 6,4 bei 30° C nach Titration mit NaOH.

Das Medium wird nach der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode autoklaviert. Vor dem Autoklavieren wird dem Medium Resazurin (1 % vol/vol) und Cystein (5,0 mM) zugesetzt und es wird so lange mit N<sub>2</sub> begast, bis ein Farbumschlag von lila nach rosa sichtbar wird. Anschließend wird die Tyrode-Lösung für 40 min bei 2 bar autoklaviert.

Perfusionsmedium für Langendorff-Herzen:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (140,0), NaHCO<sub>3</sub> (24,0), KCl (2,7), MgCl<sub>2</sub> (1,0), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4), CaCl<sub>2</sub> (1,8), Glucose (5,0)

Ein konstanter pH-Wert von 7,4 bei 37°C wird durch die kontinuierliche Begasung mit Carbogen (O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>) gewährleistet.

Kardioplegisches Perfusionsmedium für Langendorff-Herzen:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (127,7), NaHCO<sub>3</sub> (24,0), KCl (15,0), MgCl<sub>2</sub> (1,0), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4), CaCl<sub>2</sub> (1,8), Glucose (5,0)

Ein konstanter pH-Wert von 7,4 bei 37°C wird durch die kontinuierliche Begasung mit Carbogen (O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>) gewährleistet.

**2.2.3 Elektrophorese-Medien**Persechini „Urea-Gel-Buffer“:

Zusammensetzung: Tris (240 mM), Glycin (276 mM)

Aufbewahrung bei 4° C und pH 8,8 - 8,9.

Persechini „Urea-Glycerol-Gel“:

Zusammensetzung: Glycerol 40 %, Acrylamid 10 %, N,N-methylenbisacrylamid 0,4 %, Tris 20 mM, Glycin 23 mM, Temed 0,015 %, Ammoniumpersulfat 0,04 %

Persechini „Lower Buffer“:

Zusammensetzung: Tris (20 mM), Glycin (23 mM)

Persechini „Upper Buffer“:

Zusammensetzung: Tris (20 mM), Glycin (23 mM), DTT (2,4 mM), Thioglycolat (2,3 mM)

Lysispuffer:

Zusammensetzung: Urea (9 M), DTT (10 mM), Thioglykolat (5 mM), Imidazol (60 mM), Tris (20 mM), Glycin (23 mM), pH-Wert: 8,8

Blotpuffer:

Zusammensetzung: Tris (25 mM), Glycin (150 mM), MeOH 10 %, pH-Wert: 8,3.

TBS-Puffer:

Zusammensetzung: Tris (10 mM), NaCl (150 mM), pH-Wert: 7,4.

Substratpuffer:

Zusammensetzung: Tris (100 mM),  $\text{MgCl}_2$  (5 mM), NaCl (10 mM), pH-Wert: 9,5.

Erstantikörper:

1:1000 Monoclonal Anti Myosin Light Chain in 45 ml TBS-Puffer mit 3 % BSA und 0,1 % Triton.

Zweitantikörper:

1:1000 Anti-Mouse IgM – AP Conjugate in 45 ml TBS-Puffer mit 3 % BSA und 0,1 % Triton.

## 2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur:

Präparationsbesteck

Aeskulap, Heidelberg

Langendorff-Apparatur

Eigenbau, Werkstatt des  
Physiologischen Institutes  
der JLU Gießen



Gewebehacker	HSE, March-Hugstetten
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan

Fluoreszenzmessung:

Inverses Mikroskop IX 50	Olympus, Hamburg
Imago CCD Kamera	Tillvision, Martinsried
PC Pentium 1,5 GHZ	Dell, Langen
Analysesoftware Photonics	Tillvision, Martinsried
Bildschirm 19 Zoll	Samtron, Schwalbach
Monochromator / Lichtquelle Polychrome IV	Tillvision, Martinsried

Anoxie-Reoxygenationsexperimente:

Edelstahlkapillaren	Latek, Eppelheim
Perfusionshahn	Latek, Eppelheim
Perfusionskammer	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU Gießen
Perfusionsheizung	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU Gießen

Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
------------------	---------------------------

Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
--------------------	----------------------

Druckstabile Glasgefäße mit verschließbarem Deckel	All American, Canada
---	----------------------

Gasdichte Schläuche	Kalensee, Gießen
---------------------	------------------

Gasventile	Kalensee, Gießen
------------	------------------

Experimente am isolierten Herzen:

Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU Gießen
-----------------------	---

Peristaltikpumpe Minipuls 3	Gilson, USA
-----------------------------	-------------

Trockenschrank	Memmert, Schwarbach
----------------	---------------------

Waage „AB104“	Mettler Toledo, Gießen
---------------	------------------------

Persechini-Gelelektrophorese:

Mini-Gel-System Modell SE 250	Amersham Biosciences, Freiburg
-------------------------------	-----------------------------------

Power Supply Power Pack P25	Biometra, Göttingen
-----------------------------	---------------------

Photoscanner PowerLook III	Amersham Biosciences, Freiburg
----------------------------	-----------------------------------

Auswertesoftware ImageQuant V3.3	Amersham Biosciences, Freiburg
----------------------------------	-----------------------------------

Filterpapier „Universal Trockenpapier“	Biotec-Fischer, Reiskirchen
--	-----------------------------

Sonstige Geräte:

Glasgeräte	Schott, Mainz
Inkubator	Kendro, Hanau
Magnet-Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Perfusionsheizung	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU Gießen
pH-Meter	WTW, Weinheim
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Kendro, Hanau

Verbrauchsmaterialien:

Kulturschalen Falcon 3001 (3 cm) & 3803 (10 cm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Deckgläser (Durchmesser 25 mm)	Menzler Gläser, Schwerte

### **3 METHODEN UND PROTOKOLLE**

#### **3.1 Versuche zur Simulation von Ischämie und Reperfusion an koronarovaskulären Endothelzellmonolayern**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Als Modell wurden mikrovaskuläre Koronarendothelien männlicher 200 - 300 g schwerer Ratten verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität gezüchtet und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin) und Wasser.

##### **3.1.2 Präparation von mikrovaskulären koronaren Endothelzellen adulter Ratten**

Die mikrovaskulären, koronaren Endothelzellen wurden nach der von Piper et al. (1990) beschriebenen Methode isoliert.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Powell Medium: NaCl (110,0 mM), NaHCO<sub>3</sub> (25,0 mM), KCl (2,6 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,2 mM), Glukose (11,0 mM).  
pH = 7,4 bei Begasung mit Carbogen.

Kollagenasepuffer: Powell-Medium (50 ml), Kollagenase (25 mg),  
Ca<sup>2+</sup>-Stammlösung (12,5 µl).

Kultivierungsmedium: Medium 199 / CO<sub>2</sub>  
20 % mixed Serum (NCS : FCS = 1 : 1)  
5 % Penicillin-Streptomycin (1. und 2. Tag)  
2 % Penicillin-Streptomycin (ab 3. Tag)

Ca<sup>2+</sup>-Stammlösung: CaCl<sub>2</sub> (100,0 mM)

Die Tiere wurden mit Ether narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Dann wurde der Thorax eröffnet, Herz und Lunge angehoben, vom Körper getrennt und sofort in kalte, isotonische NaCl-Lösung gelegt. In dieser Lösung wurde das Herz freipräpariert und anschließend mit der Aorta in eine Langendorff-Apparatur eingebunden. Zunächst wurde das Herz mit Powellmedium (20 ml) perfundiert, um das verbliebene Blut aus den Koronarien zu entfernen. Anschließend erfolgte eine rezirkulierende Perfusion (2 - 3 ml / min) mit dem Kollagenasepuffer, für 30 Minuten. Das Medium wurde dabei konstant auf 37° C erwärmt. Nach Beendigung der Rezirkulationsphase wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgeschnitten und mechanisch mit einem Gewebehacker zerkleinert.

Danach schloss sich eine 5-minütige Inkubation des Zellhomogenats in Kollagenasepuffer (37° C) unter Carbogenbegasung an. In dieser Lösung wurde die Vereinzelung der Endothelzellen durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer 5 ml Pipette unterstützt. Als nächster Schritt folgte die Filtration der Zellsuspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße), um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Das Filtrat wurde anschließend bei 25 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, über dem Pellet aus Herzmuskelzellen, wurde entnommen und mit Trypsin und Ca<sup>2+</sup> versetzt. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten wurde die Zellsuspension eines Herzens mit einer Dichte von 10<sup>6</sup> pro 10 cm Plastik-Kulturschalen ausplattiert und im CO<sub>2</sub> Brutschrank für 4 Stunden inkubiert.

### **3.1.3 Zellkultur**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Endothelzellen gewaschen, danach mit 30 ml des Kultivierungsmediums überschichtet und im Brutschrank aufbewahrt.

Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Nach 7 Tagen waren die Zellen konfluent und konnten trypsinisiert werden. Dazu wurden die Endothelzellen mehrmals mit calciumfreier HEPES-gepufferter Tyrodelösung gespült um tote Zellen, Zellbestandteile und Verunreinigungen zu beseitigen. Außerdem wurde bei diesem Vorgang  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Zell-Zell- bzw. Zell-Umgebungskontakten gespült und damit der nachfolgende Trypsinierungsvorgang erleichtert. Anschließend wurden sie mit 5 ml Trypsin bei 37°C zehn Minuten lang inkubiert und mechanisch, durch Auf- und Absaugen mit einer 10 ml Pipette, voneinander getrennt. Diese Suspension wurde in 37 °C warmes Kultivierungsmedium gegeben und in 30 mm Plastik Kulturschalen, die jeweils ein 20 mm Glasdeckgläschen enthielten, mit einer Dichte von etwa  $7 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Am 3. Tag war auf den Deckgläschen ein konfluent Monolayer gewachsen, der für die Versuche verwendet werden konnte.

### **3.1.4 Experimente**

#### **3.1.4.1 Apparative Vorraussetzungen**

Es wurden Anoxie-Reoxygenationsversuche durchgeführt die Ischämie-Reperusionsbedingungen simulierten.

Zur Durchführung der Anoxie-Reoxygenationsexperimente war es notwendig, daß das Perfusionssystem gasdicht verschlossen war. Die autoklavierten Medien wurden mittels gasdichter Edelstahlkapillaren mit der Perfusionskammer (1ml Volumen) verbunden. In diese wurden die Deckgläschen mit den darauf angehefteten Zellen eingebaut. Anschließend wurde die Kammer fest verschraubt. An die Kammer wurde eine Peristaltikpumpe angeschlossen, die das Medium mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min durch das Perfusionssystem pumpte. Das normoxische Medium wurde vor und während der Experimente mit Raumluft, das anoxische Medium mit N<sub>2</sub> (100 %) begast. Die Temperatur in der Perfusionskammer betrug 30°C. Der Sauerstoffpartialdruck im anoxischen

Medium wurde mit einem polarografischen Sauerstoffsensor direkt hinter der Perfusionskammer bestimmt und lag bei weniger als 1 mmHG.

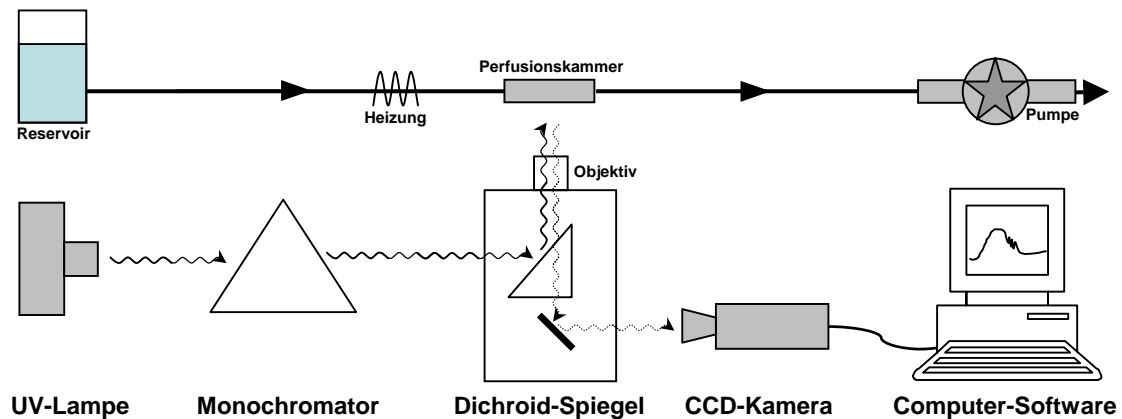


Abb. 3.1.4.1 Vereinfachte schematische Darstellung der Apparatur. Der Strahlengang des Anregungslichtes ist als durchgezogene, der Strahlengang des Fluoreszenzlichtes als gestrichelte Welle dargestellt.

Alle Versuche begannen mit einer 5-minütigen Äquilibrationsphase in der normoxisches Medium mit einem pH-Wert von 7,4 ohne Glucose eingesetzt wurde. Die Endothelzellen wurden 40 Minuten lang anoxisch mit einer HEPES-gepufferten Tyrode-Lösung, glukosefrei und mit einem pH-Wert von 6,4, inkubiert und anschließend 30 oder 60 Minuten lang bei einem pH-Wert von 7,4 und 5 mM Glukose reoxygeniert. Mit Beginn der Reoxygenation wurden verschiedene Bedingungen und Substanzen getestet.

### 3.1.4.2 Protokolle

Die Reperusionsbedingungen wurden variiert um die Zusammenhänge von intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und extrazellulärer ATP-Applikation mit dem reperusionsinduzierten Zellschaden aufzudecken. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verschiedenen Bedingungen in der 30-minütigen Reoxygenationsphase:

Kapitel	Zusammensetzung des Reperfusionsmediums (Minuten 1-30)
4.1.1/4	Normoxisches Medium
4.1.2/4	Normoxisches Medium + 10 $\mu$ M ATP
4.1.3	Normoxisches Medium + 25 $\mu$ M BAPTA
4.1.3	Normoxisches Medium + 10 $\mu$ M ATP + 50 $\mu$ M BAPTA
4.1.5	Normoxisches Medium + 10 $\mu$ M ATP + 10 $\mu$ M 8-PT
4.1.5	Normoxisches Medium + 10 $\mu$ M ATP + 500 $\mu$ M Suramin

Ausserdem wurden Versuche durchgeführt bei denen das ATP nach 30 Minuten Reperfusion weitere 30 Minuten ausgewaschen wurde, um die Reversibilität der beobachteten Effekte zu untersuchen:

Kapitel	Zusammensetzung des Reperfusionsmediums in Minuten 1-30 / Minuten 31-60	
4.1.6	Normoxisches Medium (NM)	NM
4.1.6	NM + 10 $\mu$ M ATP	NM

### 3.1.4.3 Messparameter

In der folgenden Tabelle sind die in den Experimenten gemessenen Parameter zusammengestellt und charakterisiert:

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt	In r.E. des Fura-2-Quotienten oder als Absolutwerte	Fura-2-Quotient
Interzellularspaltenbildung	In Prozent, bezogen auf die Lückenbildung während der Anoxie	Fura-2, planimetrische Analyse
MLK-Phosphorylierung	In Prozent, bezogen auf die Summe der MLK's	Gelelektrophorese nach Persechini



### **3.1.5 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von $\text{Ca}^{2+}$**

Die Messungen wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskopes durchgeführt, welches an das Till Vision-System gekoppelt war. Mit Hilfe eines Monochromators konnte das Anregungslicht, das von einer UV-Lampe entsendet wurde, entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes eingestellt werden. Diese selektierten Wellenlängen betrugen 340, 361 und 380 nm für Fura-2 AM. Der Lichtstrahl wurde über ein Glasfaserkabel auf einen Dichroiden gelenkt, welcher das Licht weiter auf die Messkammer mit den zu messenden Zellen leitete. Dies führte zur Anregung des Farbstoffes Fura-2 AM. Das emittierte Licht gelangte über den Dichroiden zu einer Kamera. Von dort wurde es im Computer aufgezeichnet und wie unten beschrieben ausgewertet.

Um die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu bestimmen, wurden die Zellen für 90 min bei Raumtemperatur mit Fura-2 AM (2,5  $\mu\text{M}$ ) in HEPES - Medium 199 beladen. Fura-2 gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen, wird dort von zellulären Esterasen gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr durch die Membran permeieren.

Die Anregung von Fura-2 erfolgte alle 6 Sekunden mit den Wellenlängen 340, 361 und 380 nm, das Emissionsmaximum lag bei 510 nm. Aus den genommenen Daten wurde der Quotient (engl.: Ratio) R der Emissionsintensitäten bei Anregung mit 340 nm und bei Anregung mit 380 nm (340 nm / 380 nm) ermittelt. Mit diesem Quotienten wurde die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration berechnet (siehe unten). Danach wurden die Fura-2-Quotienten auf einen präanoxischen Ausgangswert von 1,2 normiert und in den Abbildungen als relative Einheiten (r.E) dargestellt.

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration wurde nach folgender Formel (Grynkiewicz et al. 1985) berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times b \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

Der  $K_d$  - Wert ist ein Maß für die Affinität von Fura-2 zu freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen. Dieser Wert variiert mit den experimentellen Bedingungen und ist vom pH - Wert abhängig. In vitro beträgt der  $K_d$  - Wert für Fura-2 AM 224 nmol / l (Grynkiewicz et al. 1985). In vivo ermittelten Ladilov et al. (2000) bei einem intrazellulären pH - Wert von 7,2 einen  $K_d$  - Wert von  $309 \pm 8$  nmol / l ( $n = 6$ ), bei einem intrazellulären pH-Wert von 6,5 einen  $K_d$  - Wert von  $347 \pm 7$  nmol / l ( $n = 5$ ). Zur Bestimmung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden die von Ladilov et al. (2000) ermittelten  $K_d$  - Werte verwendet. Der Faktor b ist der Quotient der Emissionsintensität der 380 nm - Wellenlänge des  $R_{\min}$  - Wertes durch die Emissionsintensität der 380 nm - Wellenlänge des  $R_{\max}$  - Wertes.

Im Falle einer Kalibrierung wurde diese nach dem von Li et al. (1987) beschriebenen Protokoll modifiziert durchgeführt.

Kalibrierungslösung:

- NaCl (10 mM), KCl (125 mM),  $\text{MgSO}_4$  (1 mM), HEPES (25 mM), Ionomycin (5  $\mu\text{M}$ )
- Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  (3 mM) oder EGTA (5 mM) und BAPTA (10  $\mu\text{M}$ )
- pH 7,4 bei 30° C, titriert mit 1 N KOH

Zur Bestimmung des  $R_{\max}$  - Wertes (maximaler Quotient = engl.: maximum Ratio) wurde dem Perfusat 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , zur Bestimmung des  $R_{\min}$  - Wertes (minimaler Quotient = engl.: minimum Ratio) 5 mM EGTA und 10  $\mu\text{M}$  BAPTA zugesetzt.

### 3.1.6 Bestimmung der Größe der Interzellularspaltenbildung

Zur Messung der Interzellularspaltenbildung war es notwendig eine Fluoreszenzwellenlänge zu wählen, bei der das fluoreszierende Signal nicht von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig ist. Dazu wurde bei hohen und niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ein Wellenlängenspektrum gemessen und darüber die Wellenlänge ermittelt, bei der sich die Intensität nicht ändert. In unserem System beträgt die isosbestische Wellenlänge 361 nm.

Die Sequenz der genommenen Bilder wurde binarisiert. Das bedeutet, dass Arealen mit Fluoreszenzsignal der Wert 1, Arealen ohne Fluoreszenzsignal der Wert 0 zugewiesen wurde. Diese „0-Areale“ wurden nun Lücken, die „1-Areale“ zellbedeckten Flächen zugeordnet. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines Programmes welches die 0-Pixel für jedes Einzelbild einer kompletten Filmsequenz zusammenzählte.

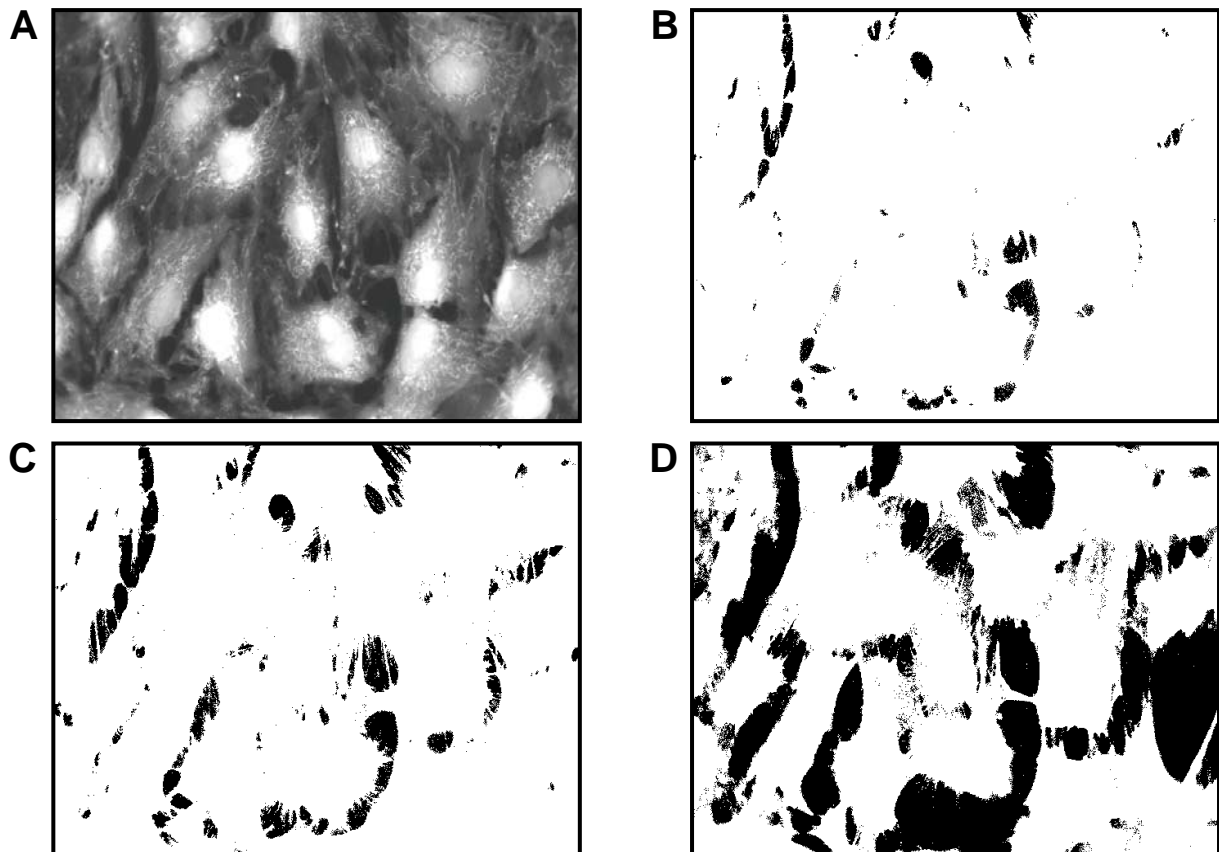


Abb. 3.1.6 Abbildung der mit Fura-2 AM beladenen Zellen. Bild A zeigt eine Originalaufnahme zu Versuchsbeginn. Bilder B – C zeigen binarisierte Aufnahmen zu Versuchsbeginn (B), nach Anoxie (C) und nach der Reperfusion (D).

Das zu messende Zellareal wurde so ausgewählt, dass am Versuchsbeginn zirka 2 % - 4 % der Pixel im Gesichtsfeld Lücken zuzuordnen waren. Diese Lücken vergrößerten sich dann typischerweise nach 40 min Anoxie (pH 6,4) auf 15 % - 20 % der Pixel. In der 30-minütigen Reperfusion wurde eine weitere Zunahme der Lücken um durchschnittlich 15 % - 20 % der Gesamtpixel beobachtet.

Mit diesem Verfahren kann die prozentuale Zunahme der interzellularen Lücken im Verhältnis zur Zellfläche ermittelt werden. Zur Auswertung wird die Anzahl der 0-Pixel während der 5 minütigen Normoxie (pH 7,4) auf 0 % und die endanoxische Anzahl auf 100 % gesetzt. Die Änderung der Interzellularspaltengröße in der Reperfusion wird prozentual auf die Änderungen in der Anoxie bezogen. Experimente bei denen sich infolge der Lückenbildung die Anzahl der Zellen verringert (Abnahme der Anzahl der Zellkerne), wurden nicht mit zur Auswertung herangezogen.

### **3.1.7 Bestimmung der Myosinleichtkettenphosphorylierung**

Um den Aktivierungszustand des endothelialen kontraktiven Apparates während simulierter Ischämie und Anoxie zu bestimmen, wurden spezielle Glycerol-Harnstoff Gelelektrophoresen durchgeführt und damit die Phosphorylierungszustände der Myosinleichtketten bestimmt (Persechini et al 1986).

#### Probennahme:

Zur Probengewinnung wurde das Perfusionsmedium, an den zuvor spezifizierten Zeitpunkten im Versuchsverlauf, zügig vom Endothelzellmonolayer entfernt und der Phosphorylierungsvorgang mit 1 ml eisgekühlter zehnprozentiger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. In den folgenden 30 - 60 Minuten wurden die Zellen kontinuierlich eisgekühlt, danach mit einem Zellschaber vom Deckglas gelöst und mit der Trichloressigsäure in ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Gefäß überführt. Nun wurden die Zellen 30 Minuten lang bei 4° C mit 40000 x g zentrifugiert. Anschliessend wurde die TCA restlos entfernt. Das Zell-Pellet wurde mit 200 µl Ether gewaschen und wiederum abzentrifugiert (5 min, 4° C, 40000 x g). Darauf wurde der Überstand vorsichtig abgezogen. Die so präparierten Proben wurden bei -80° C über Nacht aufbewahrt.

Elektrophorese:

Am Folgetag wurden die zur Herstellung der Gele benötigten Substanzen (siehe Kapitel 2.2.3) in einem Erlenmeyerkolben angesetzt. Anschliessend wurde das Gemisch unter ständigem Rühren mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe 5 Minuten lang entgast. Das Gel wurde in die gesäuberten, fertig montierten Gelkammern gegossen und polymerisierte innerhalb 30 bis 60 Minuten vollständig aus. Anschließend wurden die Elektrophoresekammern montiert, mit „Upper-Buffer“ und „Lower-Buffer“ befüllt, die Kühlung (4° C) in Betrieb genommen und die einstündige Vorelektrophorese mit 400 V gestartet.

Die Proben wurden langsam auf 20° C erwärmt und anschließend vollständig in jeweils 20 µl Lysispuffer (37° C) gelöst und mit 2,5 µl Bromphenolblau versetzt. Nach abgelaufener Vorelektrophorese wurden die Taschen der Gele mit jeweils 15µl der entsprechenden Lysate beladen. Die Elektrophorese wurde nun 70 Minuten lang mit 400 V Elektrodenspannung und 4° C Geltemperatur durchgeführt.

Western-Blot:

Nach der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig aus den Kammern entnommen und auf eine Blotmembran übertragen, die mit 100 % MeOH benetzt, mit destilliertem Wasser äquilibriert und anschliessend mit Blotpuffer (siehe Kapitel 2.2.3) getränkt war. Die Membran wurde zwischen jeweils 3 Lagen Filterpapier, anodenseitig mit dem Gel beladen, gelegt. Dieser Aufbau (Anode – 3 Lagen Filterpapier – Gel – Blotmembran – 3 Lagen Filterpapier – Kathode) wurde nun reichlich mit Blotpuffer getränkt. Der Blotvorgang dauerte 75 min bei 160 mA – 180 mA. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran von Gelresten befreit und mit Methanol benetzt.

Blotentwicklung:

Die mit MeOH benetzte Membran wurde 2 Minuten in destilliertem Wasser äquilibriert und danach 30 Minuten lang mit 3 % BSA in TBS geblockt. Als nächstes wurde die Membran 3 Stunden lang mit dem Erstantikörper (Anti - MLK)

inkubiert und danach dreimal für jeweils 5 - 10 Minuten mit TBS und 0,1 % Triton gewaschen. Nach der nun folgenden, 90 Minuten dauernden Zweitantikörperinkubation (Anti-Mouse-IgM) wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 5 - 10 Minuten mit TBS und 0,5 % Triton gewaschen und anschliessend 20 Minuten lang mit 10 mM Tris in HCl umgepuffert. Die Entwicklung fand unter Sichtkontrolle in stark abgedunkelter Umgebung mit einem Substratpuffer statt, dem pro 45 ml 15 mg NBT und 7,5 mg BCIP zugesetzt waren und dauerte etwa 20 - 40 Minuten. Nach der Entwicklung wurde die Blotmembran in destilliertes Wasser überführt um die Reaktion zu stoppen. Nach 10 Minuten Wässerung wurde die Membran auf Filterpapier gelegt und an der Luft getrocknet.

#### Auswertung:

Die entwickelten Blots wurden nun mit einem Photoscanner digitalisiert und die Verteilung der MLK -Phosphorylierungszustände „nicht phosphoryliert“ (MLK), „mono-“ (MLK-P) und „diphosphoryliert“ (MLK-PP) durch eine densitometrische Auswertung bestimmt. Anschliessend wurde die Summe der gebundenen Phosphatreste auf die Gesamtheit der Myosinleichtketten bezogen (nach folgender Formel:  $\text{MLK-Phosphorylierung} = ((2 \times \text{MLK-PP}) + \text{MLK-P}) / \text{total MLK} \times 100$ ) und in Prozentwerten dargestellt. Da MLK sowohl einfach als auch zweifach phosphoryliert vorliegen kann, kann die „MLK-Phosphorylierung“ Werte zwischen null Prozent und zweihundert Prozent annehmen.

## **3.2 Versuche zu Ischämie und Reperfusion an isolierten Herzen**

### **3.2.1 Versuchstiere**

Für die Experimente wurden die Herzen männlicher 200 - 300 g schwerer Wistar Ratten genutzt. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig Universität gezüchtet und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin) und Wasser.

### **3.2.2 Präparation der Herzen**

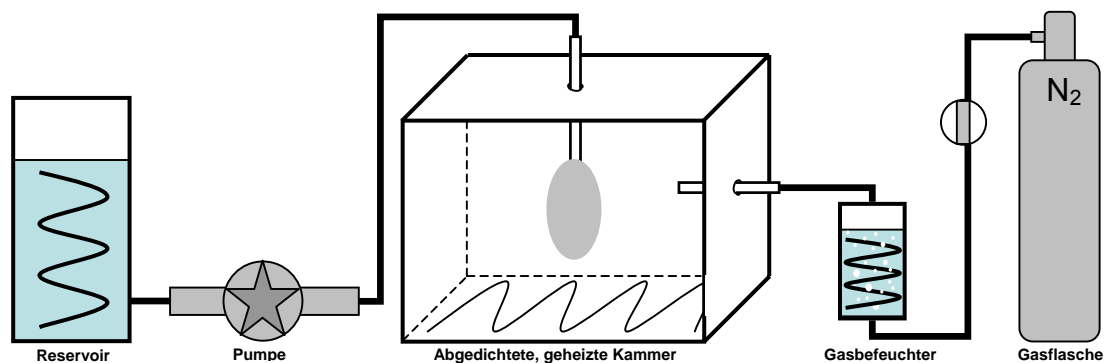
Die Tiere wurden mit Ether narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Dann wurde der Thorax eröffnet, das Perikard entfernt, Herz und Lunge angehoben, mit einem Scherenschnitt vom Körper getrennt und sofort in 4° C kalte, isotonische NaCl - Lösung gelegt. In dieser Lösung wurde das Herz grob von Geweberesten freipräpariert und anschließend mit der Aorta in eine Langendorff-Apparatur eingebunden.

### **3.2.3 Experimente**

#### **3.2.3.1 Apparative Vorraussetzungen**

Es wurden Ischämie-Reperusionsversuche im Langendorff-Modus durchgeführt. Die Herzen wurden retrograd mit 10 ml / min und pH = 7,4 bei 37° C perfundiert. Hierzu wurden die Aorten der Herzen mit der Peristaltikpumpe der Apparatur verbunden und so eine Perfusion der Koronargefäße gewährleistet.

Die Herzen waren während der Experimente von der umgebenden Raumluft isoliert und befanden sich während der normoxischen Phase der Experimente in einer 37° C warmen, wasserdampfgesättigten Atmosphäre die in ihrer Gaszusammensetzung der Umgebungsluft entsprach. Während der anoxischen Phase wurde die Umgebung der Herzen mit angewärmtem, wasserdampfgesättigtem Stickstoff (100 %) geflutet.



**Abb. 3.2.3.1 Vereinfachte schematische Darstellung der Versuchsanordnung.**

Die Herzen wurden vom 37° C warmen Perfusionsmedium, das einen pH-Wert von 7,4 hatte, mit einem konstanten Fluß von 10 ml/min 30 Minuten lang perfundiert. Danach wurden die Herzen einer 60-minütigen No-Flow-Ischämie ausgesetzt und anschließend mit einer kardioplegischen Lösung 30 Minuten lang wiederum mit 10 ml / min reperfundiert.

Ausserdem wurden Versuche durchgeführt in denen die Herzen einer 90-minütigen No-Flow-Ischämie (ohne anschließende Reperfusion) ausgesetzt wurden.

### 3.2.3.2 Experimentelle Protokolle

Das Reperfusionsmedium wurde bei einem Teil der Experimente mit 10 µM ATP supplementiert, um die Wirkung von extrazellulärem ATP auf den Ischämie-Reperfusionsschaden zu untersuchen. Außerdem wurde bei einem Teil der Experimente zusätzlich zu ATP der Adenosinrezeptorblocker 8-Phenyltheophyllin (8-PT) während der Reperfusion appliziert. Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde der Ektonucleotidasehemmer ARL 67156 zusätzlich zu ATP verabreicht.



Kapitel	Zusammensetzung des Reperfusionsmediums (Minuten 1-30)
4.2.1	Kardioplegisches Medium
4.2.1	Kardioplegisches Medium + 10 $\mu$ M ATP
4.2.1	Kardioplegisches Medium + 10 $\mu$ M ATP + 10 $\mu$ M 8-PT
4.2.1	Kardioplegisches Medium + 10 $\mu$ M ATP + 100 $\mu$ M ARL 67156

### 3.2.3.3 Messparameter

In der folgenden Tabelle sind die in den Experimenten gemessenen Parameter zusammengestellt und charakterisiert.

Parameter	Einheit	Methode
Kardiales Ödem	Gramm / Gramm	Vergleichende Gewichtsanalyse der Gewebsflüssigkeit und des Trockengewebes

### 3.2.4 Ermittlung des kardialen Ödems

Nach Beendigung der Experimente wurden die Herzen zügig aus der Apparatur entfernt, von Perfusat befreit indem die Herzhöhlen mit einem unbenutzten Einwegskalpell eröffnet wurden und ohne Zeitverzug auf einer Feinwaage gewogen. Anschliessend wurden die Herzen 24 Stunden lang bei 80° C in einem Trockenschrank getrocknet, das Trockengewicht bestimmt und das Flüssigkeitsgewicht pro Gewichtseinheit Trockengewebe berechnet.

### **3.3 Statistik**

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben. Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt (Ludbrook, 1994). Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Simulierte Ischämie und Reperfusion an endothelialen Monolayern**

Um Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die Endothelzellmonolayer 40 Minuten lang bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,4 anoxisch perfundiert und anschließend 30 oder 60 Minuten lang bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 reoxygeniert. Der Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie der interzellulären Lückenbildung wurde mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 gemessen.

#### **4.1.1 Auswirkungen von Hypoxie und Reoxygenierung auf die zytosolische $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die interzelluläre Lückenbildung**

Während der anoxischen Perfusion zeigten die Zellen einen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Dieser Calciumanstieg kann in zwei Phasen eingeteilt werden (Abb.4.1.1a). Die erste Phase umfasst ungefähr die ersten 10 Minuten und ist durch einen transienten Konzentrationsanstieg gekennzeichnet, der durch Freisetzung und Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  ins endoplasmatische Retikulum entsteht. Phase 2 ist durch einen progredienten Calciumanstieg gekennzeichnet, der von einem kontinuierlichen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum unterhalten wird (Putney 1990, Dolor et al. 1992, Schäfer et al. 2001). Dieser Anstieg ist in der Reperfusionsphase von 30 Minuten nicht reversibel, sondern setzt sich fort.

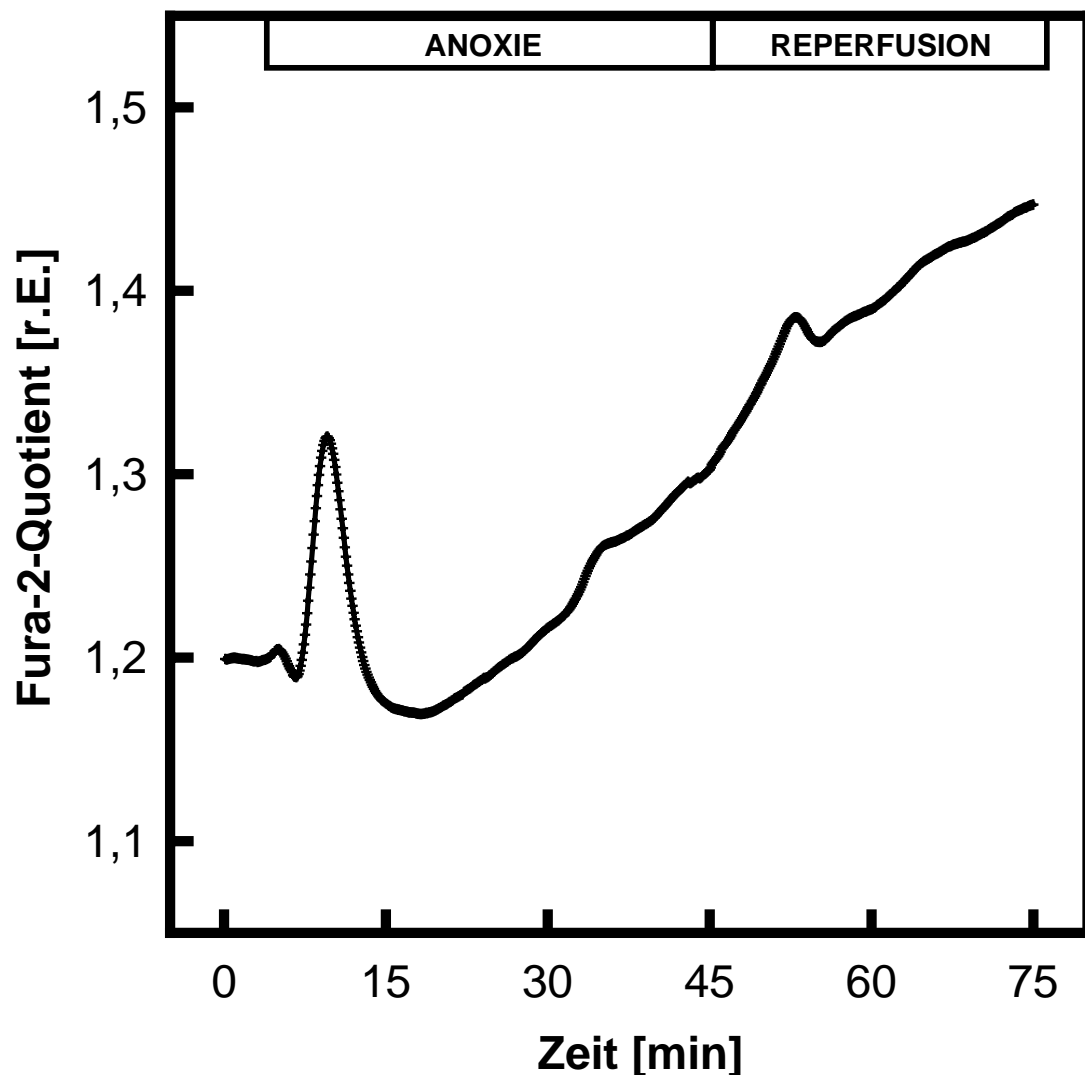


Abbildung 4.1.1a zeigt eine Originalregistrierung des Fura-2-Quotienten unter Kontrollbedingungen (5 min Normoxie, 40 min Anoxie, 30 min Reoxygenation). Dargestellt als relative Einheiten [r.E.].

In den Versuchen stieg der Fura-2-Quotient vom präanoxischen Ausgangswert  $1,20 \pm 0,02$  r.E. auf  $1,38 \pm 0,02$  r.E. endanoxisch bis auf  $1,57 \pm 0,03$  r.E. am Reperfusionsende an. Das entspricht einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $73 \pm 4$  nM in der 5-minütigen Äquilibrationphase,  $381 \pm 7$  nM am Ende der Anoxie und  $483 \pm 23$  nM am Reperfusionsende.

Im Verlauf der Anoxie entwickelten sich interzelluläre Lücken, deren Größe kontinuierlich zunahm. Die Lückenbildung in der Reperfusion verlief deutlich

schneller als in der Anoxie.

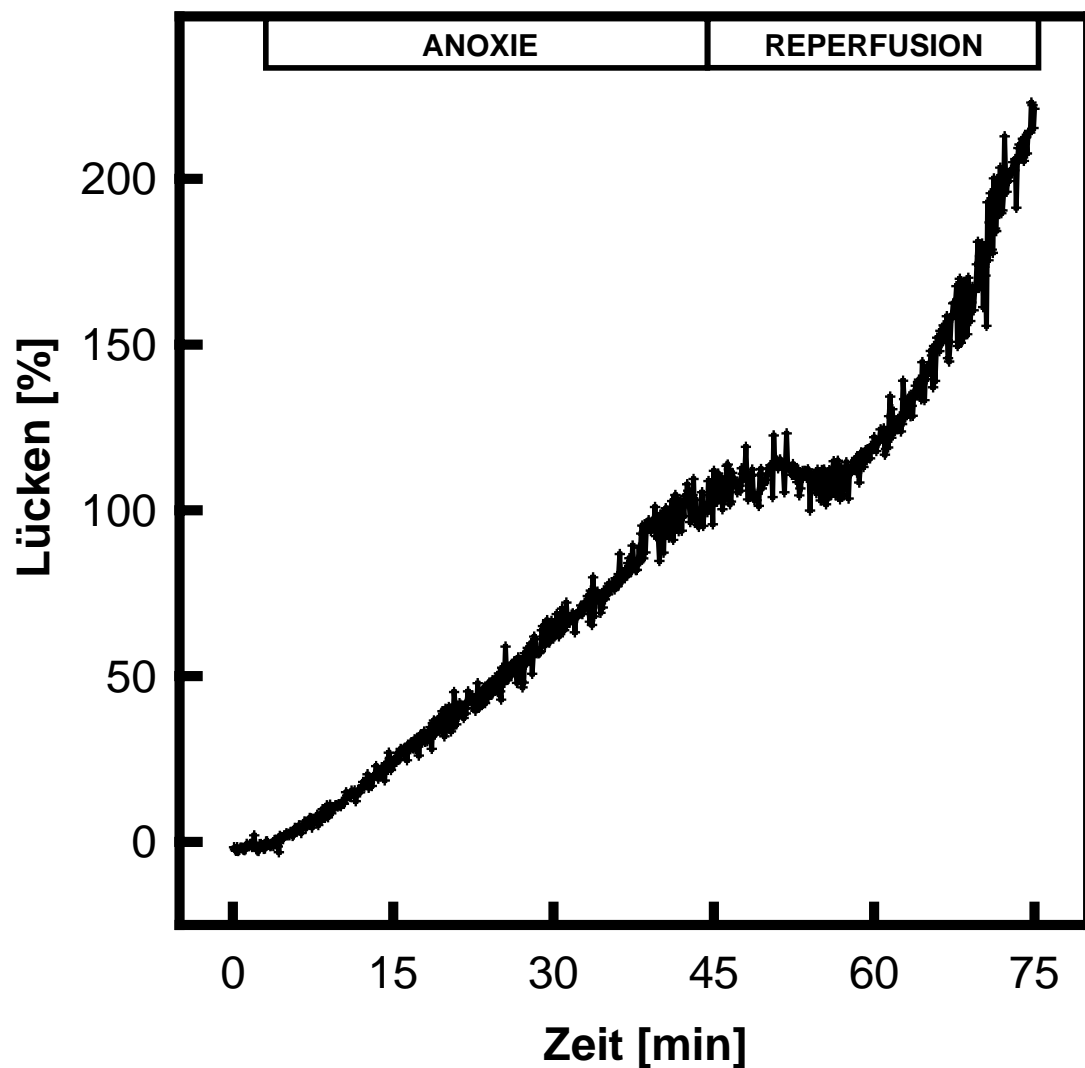


Abbildung 4.1.1b zeigt eine Originalregistrierung der interzellulären Lückenbildung unter Kontrollbedingungen (5 min Normoxie, 40 min Anoxie, 30 min Reoxygenation). Darstellung in Prozent, bezogen auf die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde.

Der endanoxische Wert der Lückenbildung wurde auf 100 % gesetzt und alle folgenden Veränderungen der Lücken hierauf bezogen. Während der 30-minütigen Reperfusion verdoppelte sich die Lückenbildung im Vergleich zur Anoxie.

#### 4.1.2 Wirkung von extrazellulärem ATP auf Koronarendothelien unter simulierten Ischämie-Reperfusionsbedingungen

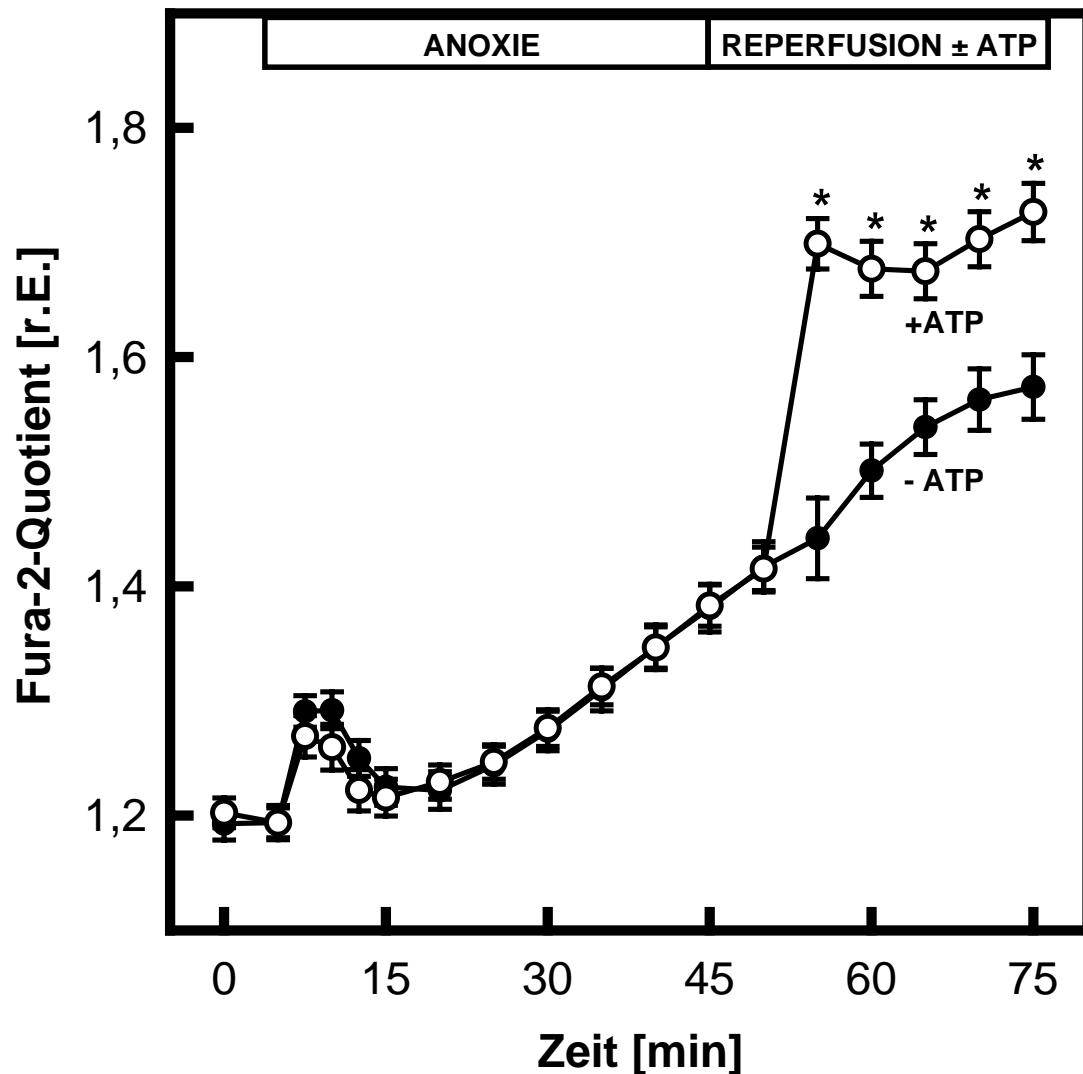


Abbildung 4.1.2a zeigt den Verlauf des intrazellulären Fura-2-Quotienten unter Reperfusionsbedingungen ohne ATP (-ATP) und bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ATP in der Reperfusion (+ATP). Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. (\*  $p < 0,05$  versus -ATP;  $n = 12$ ).

Mit Applikation von extrazellulärem ATP in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu Beginn der Reperfusion kam es zu einer ausgeprägten Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Der Fura-2-Quotient nach 30 Minuten Reoxygenation war bei ATP-Applikation gegenüber Kontrollbedingungen (-ATP) deutlich erhöht.

Die Lückenbildung unter diesen Bedingungen zeigt die nächste Grafik:

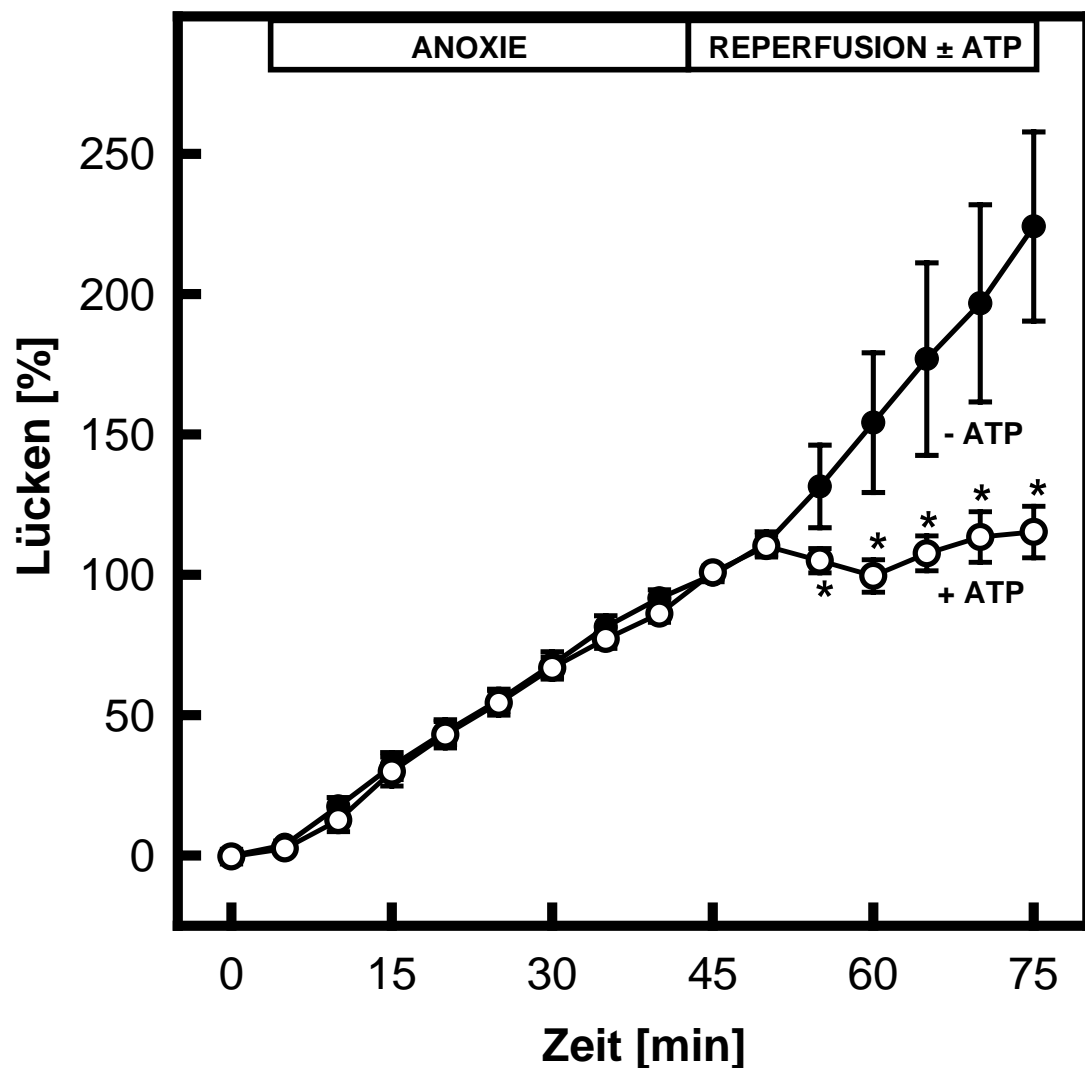


Abbildung 4.1.2b zeigt den Verlauf der interzellulären Lückenbildung unter Reperfusionsbedingungen ohne ATP (-ATP) und bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ATP in der Reperfusion (+ATP). Dargestellt sind die Mittelwerte der Lückenbildung in Prozent  $\pm$  SEM, bezogen auf die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde. (\*  $p < 0,05$  versus -ATP;  $n = 8$ ).

Die Zugabe von ATP zum Perfusionsmedium in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  führte zu einer anhaltenden Hemmung der interzellulären Lückenbildung.

Extrazellulär appliziertes ATP vermindert also die reperfusionsinduzierte Lückenbildung, obwohl es den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel anhebt.

#### **4.1.3 Einfluß der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die Wirkung von extrazellulärem ATP**

Eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann die endotheliale Barrierenfunktion stören (Noll et al. 1995). Dies ist auf eine Aktivierung des endothelialen kontraktile Apparates zurückzuführen (Noll et al. 1995, Schäfer et al. 2003). Da die Aktivierung direkt von einer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen MLK-Kinase abhängig ist (Schittler et al. 1990, Wysolmerski et al. 1990, Goeckeler et al. 1995), wurde die Rolle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bezüglich des Ischämie-Reperfusionsschadens untersucht. Die Auswirkungen auf den ATP-vermittelten Schutz vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung standen hierbei im Mittelpunkt des Interesses. Zu diesem Zweck wurde die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Reperfusion mithilfe des intrazellulär wirkenden Calciumchelators BAPTA vermindert.

Die Konzentration von BAPTA wurde so gewählt, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle am Ende des Versuches bei Werten lag, die die Zellen präanoxisch aufwiesen. Dazu war bei den Versuchen ohne ATP eine BAPTA-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  nötig. In Kombination mit ATP musste die BAPTA Menge verdoppelt werden, um die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration so weit zu senken, daß sie am Versuchsende auf diesem Niveau lag.



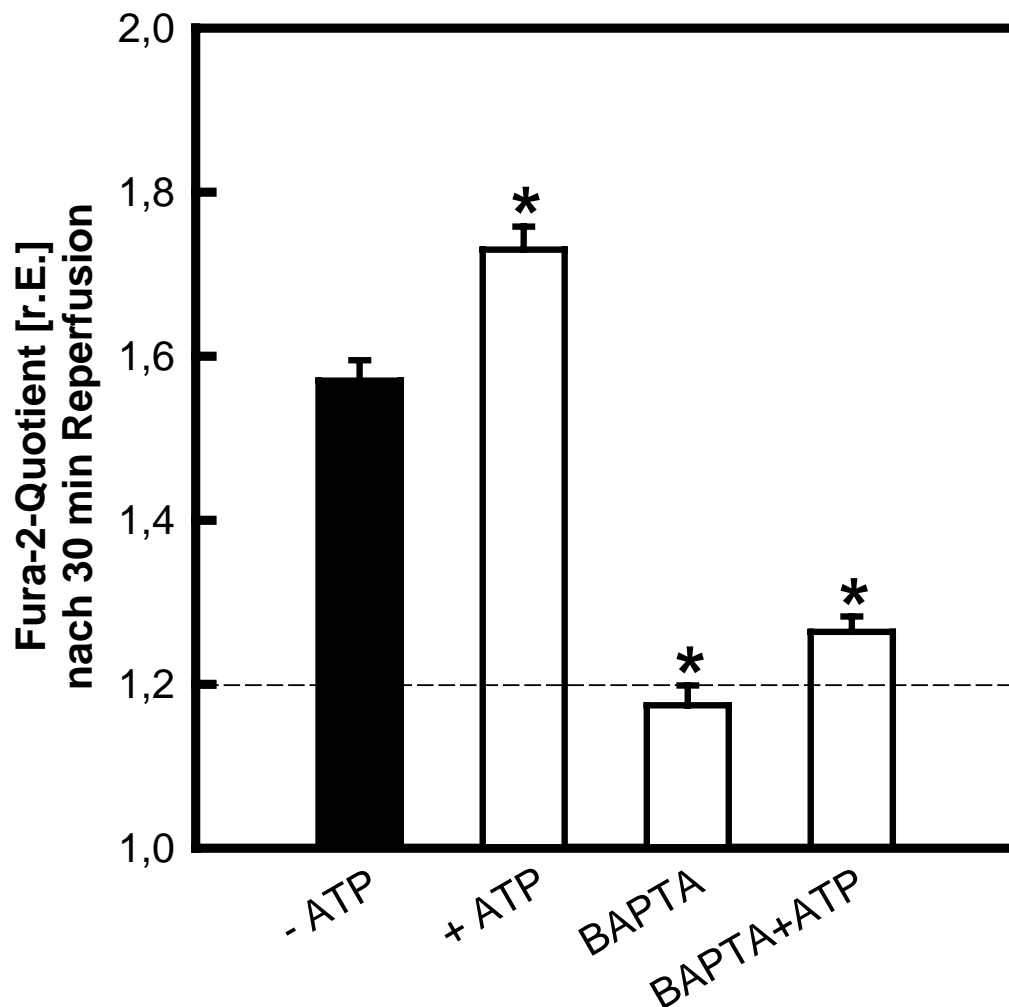


Abbildung 4.1.3a zeigt den Fura-2-Quotienten am Ende einer 30 Minuten dauernden Reperfusion bei Reperfusionsbedingungen -ATP (n = 12), +ATP (n = 12), mit BAPTA (n = 5) oder mit BAPTA +ATP (n = 11). Dargestellt sind Mittelwerte des Fura-2-Quotienten [r.E.]  $\pm$  SEM, \* p < 0,05 versus Reperfusionsbedingungen ohne ATP (-ATP). Die gestrichelte Linie markiert die Höhe des Fura-2-Quotienten von normoxischen Zellen.

Der Fura-2-Quotient unter BAPTA-Applikation erreichte am Ende der Reperfusion Werte von  $1,17 \pm 0,02$  r.E., bei gleichzeitiger BAPTA- und ATP-Gabe lag er am Reperfusionsende bei  $1,26 \pm 0,02$  r.E. Verglichen mit den Versuchen  $\pm$  ATP konnte der Fura-2-Quotient stark reduziert werden ( -ATP:  $1,57 \pm 0,03$  r.E.; +ATP:  $1,73 \pm 0,03$  r.E.).

Da die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über eine Aktivierung der MLK-Kinase kontraktionsfördernd wirken kann, untersuchten wir die Lückenbildung unter den eben beschriebenen Bedingungen.

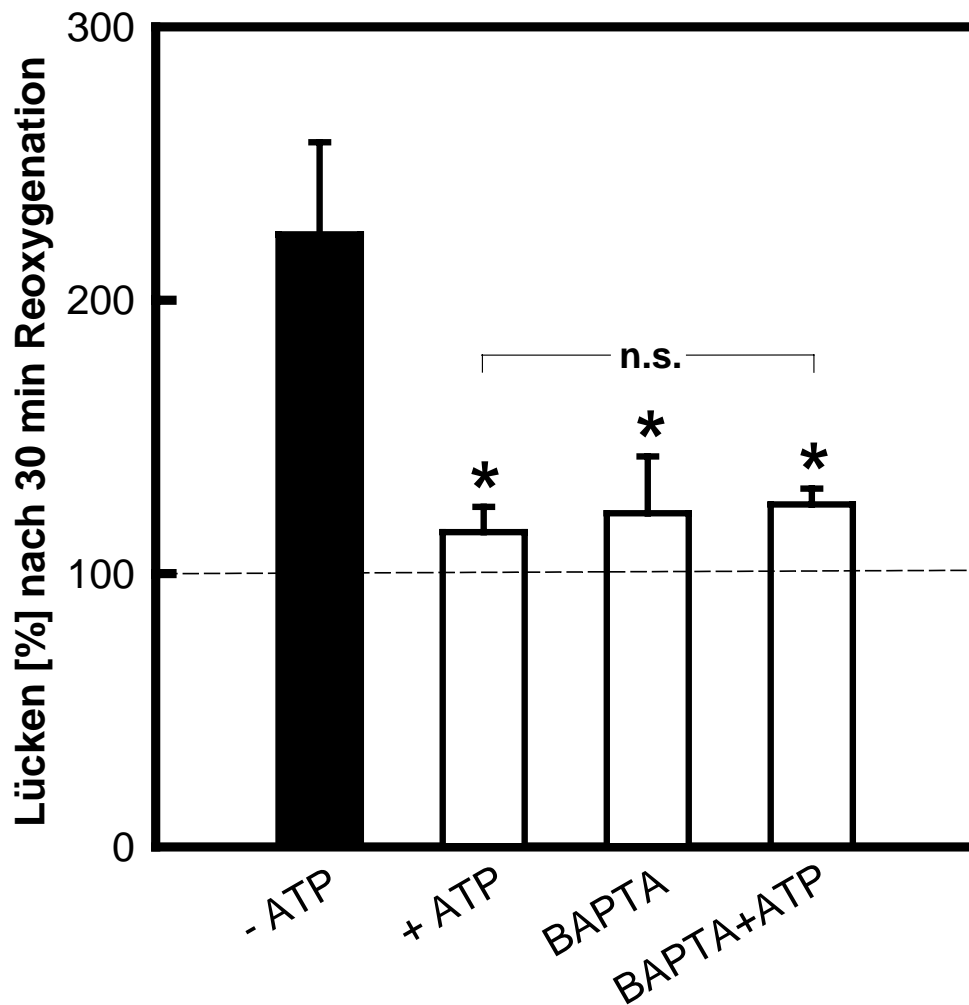


Abbildung 4.1.3b zeigt reperfusionsinduzierte Lückenbildung am Ende einer 30 Minuten dauernden Reperfusion bezogen auf die endanoxische Lückenbildung. Unter Reperfusionsbedingungen -ATP (n = 6), +ATP (n = 9), mit BAPTA (n = 5), oder mit BAPTA + ATP (n = 11). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SEM, \* p < 0,05 versus Reperfusionsbedingungen ohne ATP (-ATP); n.s., nicht signifikant. Die gestrichelte Linie markiert die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde.

Man sieht, dass eine Absenkung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels mit BAPTA in der Reperfusion für sich allein betrachtet die Lückenbildung auf  $122 \pm 21$  % gegenüber  $224 \pm 34$  % in der Kontrollgruppe (-ATP) reduzierte. In Verbindung mit

ATP (BAPTA + ATP) hatte die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch BAPTA allerdings keine zusätzlichen Auswirkungen auf die Bildung von Interzellularspalten verglichen mit der Gabe von ATP alleine. Die Lückenbildung betrug hier  $125 \pm 6 \%$  (BAPTA + ATP) gegenüber  $115 \pm 9 \%$  (+ATP).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Lückenbildung durch jeweils eines der beiden Manöver (+ATP oder BAPTA) deutlich reduziert werden kann. Eine additive Wirkung (BAPTA + ATP) tritt jedoch nicht ein.

#### **4.1.4 Die Rolle der MLK-Phosphorylierung beim ATP-vermittelten Schutz vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung**

Um den Einfluss von extrazellulärem ATP auf den Aktivierungszustand des endothelialen kontraktilen Apparates unter Ischämie-Reperfusionsbedingungen darzustellen, wurde der Phosphorylierungsgrad der Myosinleichtketten elektrophoretisch bestimmt.

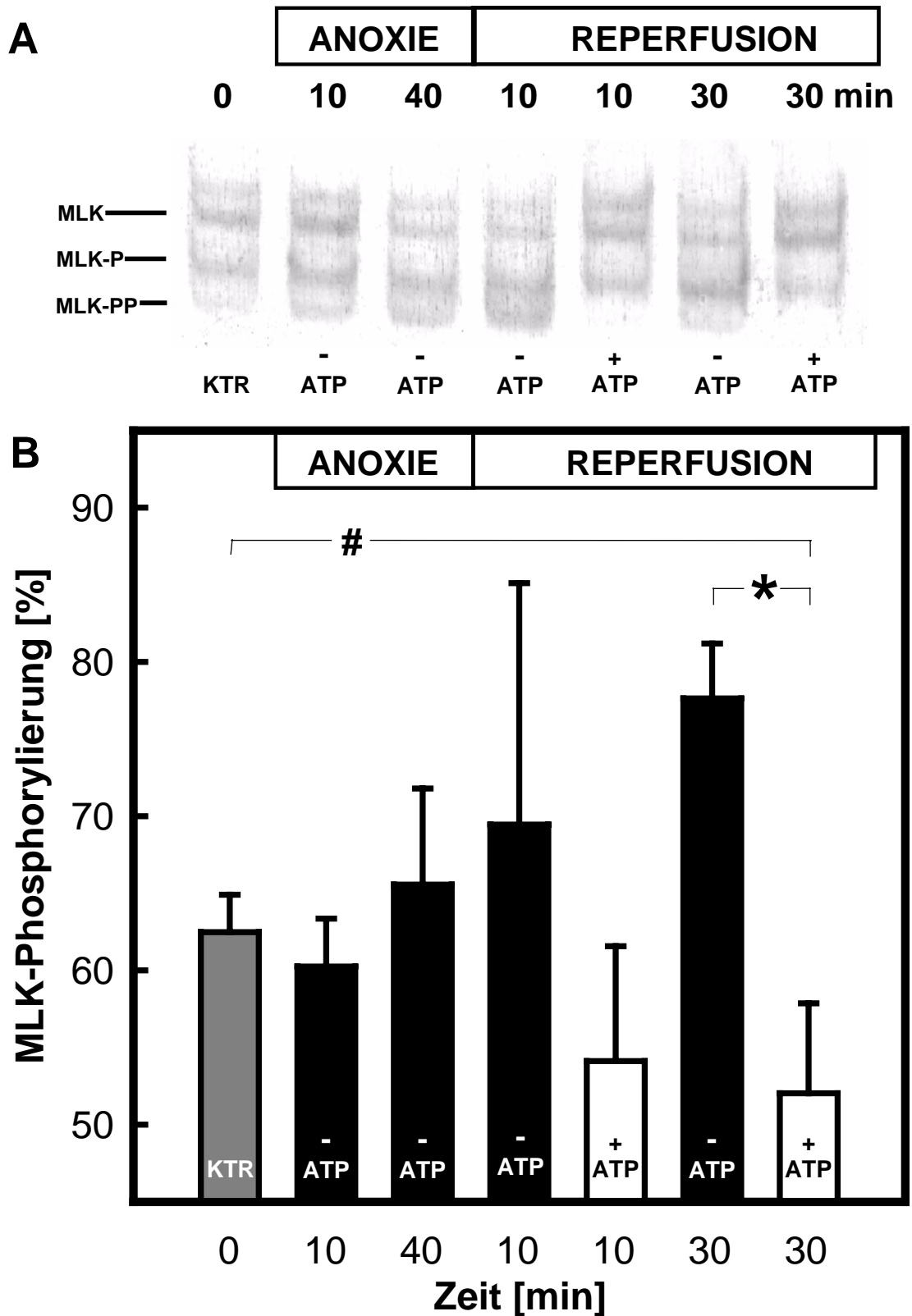


Abbildung 4.1.4 Teil A zeigt einen exemplarischen Western-Blot. Teil B zeigt die densitometrischen Auswertungen. Dargestellt ist die MLK-Phosphorylierung bei normoxischen Kontrollen, nach 10 und 40 (n = 6) Minuten Anoxie ohne ATP (-ATP) und nach 10 (n = 4) und 30 (n = 10) Minuten Reperfusion ohne ATP (-ATP) oder unter Einfluss von 10  $\mu$ M extrazellulärem ATP (+ATP). Dargestellt als Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SEM, \* p < 0,05, # p < 0,05.

Die densitometrische Auswertung der Blots ergibt, dass extrazellulär appliziertes ATP eine Phosphorylierung der Myosinleichtketten wirkungsvoll reduziert.

In der Reperfusion ohne ATP stieg der Phosphorylierungsgrad an, bei ATP-Applikation während der Reperfusion sank der Phosphorylierungsgrad ab. Am Reperfusionsende waren die Myosinleichtketten der ohne ATP reperfundierten Endothelzellen zu  $77,6\% \pm 3,6\%$  phosphoryliert, unter ATP-Applikation jedoch nur zu  $52,0\% \pm 5,8\%$  ( $p < 0,05$  vs -ATP).

ATP mindert also die Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates.

#### **4.1.5 Effektvermittlung bei extrazellulärer ATP-Applikation**

Um zu entscheiden, ob die beobachtete Hemmung der Lückenbildung tatsächlich einen ATP-Effekt und nicht die Wirkung des Abbauproduktes Adenosin darstellt, wurden Versuche durchgeführt, bei denen während ATP-Applikation die Adenosinrezeptoren mit  $10 \mu\text{M}$  8-PT blockiert wurden. In einer weiteren Versuchsreihe wurden während der ATP-Zufuhr die P2-Rezeptoren mit  $500 \mu\text{M}$  Suramin gehemmt.

Welche Auswirkungen die Blockade der genannten Rezeptoren während ATP-Applikation auf die Entwicklung der reperfusionsinduzierten Lückenbildung hatte, zeigt die nächste Grafik.

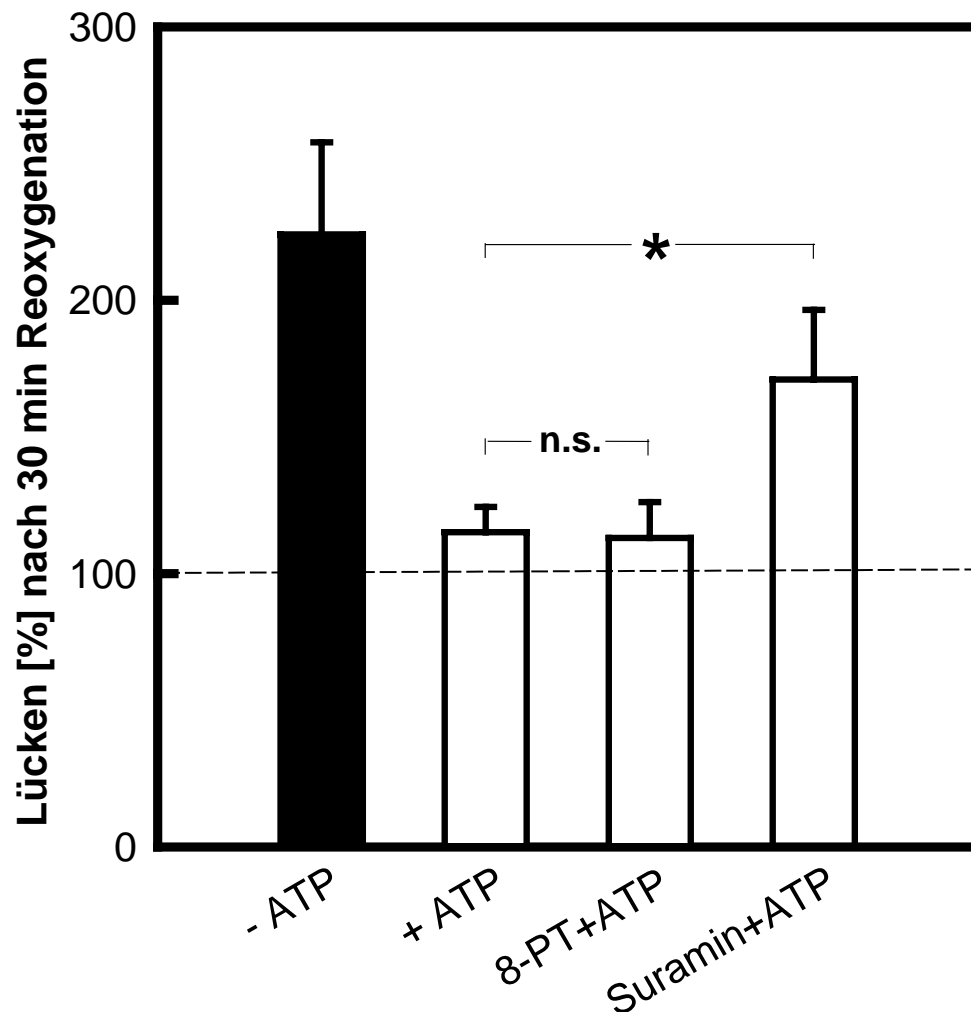


Abbildung 4.1.5 zeigt die interzelluläre Lückenbildung am Ende einer 30 Minuten dauernden Reperfusionphase bei Reperusionsbedingungen -ATP (n = 6), +ATP (n = 9) oder mit verschiedenen Rezeptorantagonisten *und* ATP in der Reperfusion: 8-PT + ATP (n = 6), Suramin + ATP (n = 6). Dargestellt als Prozentwerte bezogen auf die endanoxische Lückenbildung  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$ ; n.s., nicht signifikant. Die gestrichelte Linie markiert die endanoxische Lückenbildung, die auf 100 % gesetzt wurde.

Der Einsatz des Adenosinrezeptorblockers 8-PT während der Gabe von ATP zeigte keinen Einfluss auf den ATP-vermittelten Schutz vor reperusionsinduzierter Lückenbildung. Nach 30 Minuten Reperfusion mit ATP und 8-PT lag die Lückenbildung bei  $113\% \pm 13\%$  gegenüber  $115\% \pm 9\%$  bei ATP-Applikation ohne Rezeptorantagonisten. Im Vergleich dazu erreichte die Kontrollgruppe ohne ATP (-ATP) Werte von  $224\% \pm 34\%$ . Die Applikation von

Suramin reduzierte die ATP-vermittelte Schutzwirkung. Die Lückenbildung betrug hier  $171\% \pm 25\%$  (+ATP:  $115\% \pm 9\%$ ).

Der Schutz vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung scheint also über P2-Rezeptoren vermittelt zu sein.

#### **4.1.6 Reversibilität des ATP-Effektes**

Um zu überprüfen, ob die protektive Wirkung von ATP über den Zeitraum der Applikation hinaus anhält, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen einer 40-minütigen Anoxie ausgesetzt und danach 30 Minuten lang mit  $10\text{ }\mu\text{M}$  ATP reperfundiert wurden. Anschließend wurde die ATP-Gabe gestoppt und die Monolayer weitere 30 Minuten lang mit normoxischem Medium perfundiert.

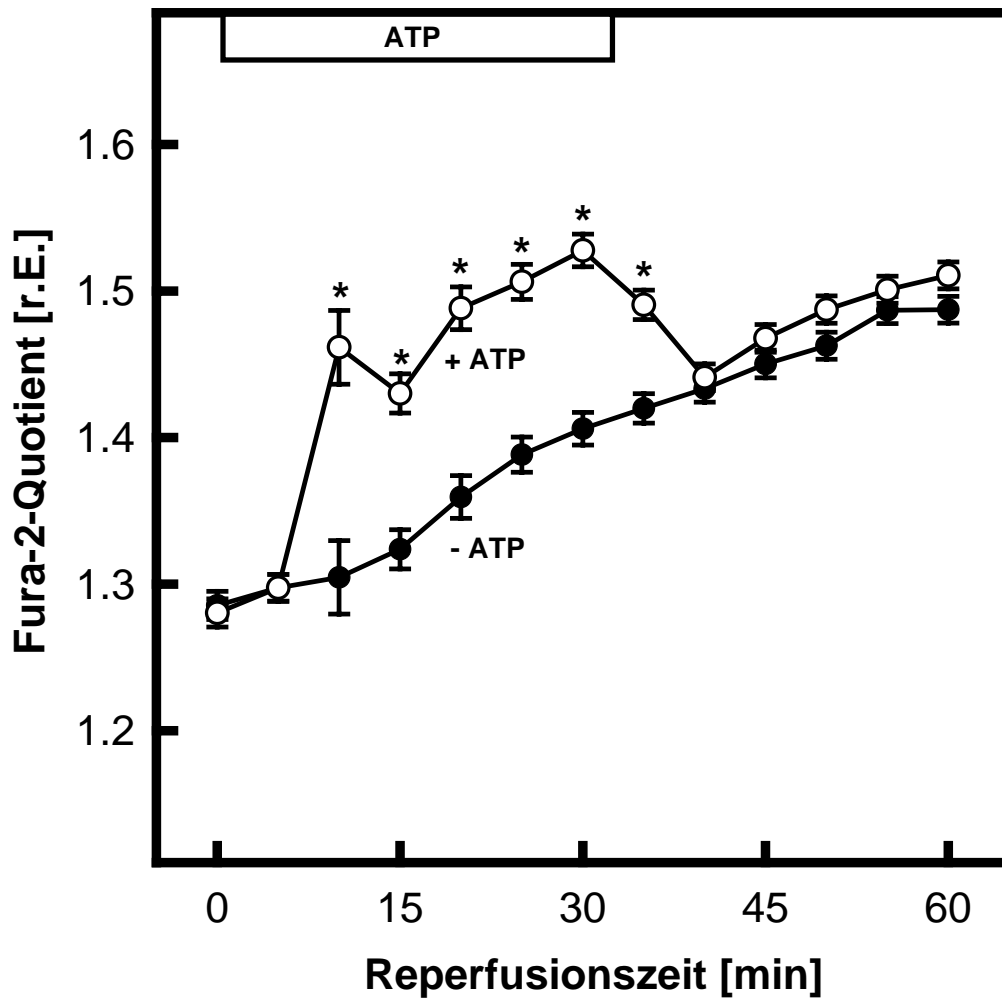


Abbildung 4.1.6a zeigt den Verlauf des Fura-2-Quotienten bei Reperfusionsbedingungen -ATP (n = 6) und bei Applikation von ATP (n = 10) während der ersten 30 Minuten der Reperfusion. Dargestellt sind Mittelwerte des Fura-2-Quotienten [r.E.]  $\pm$  SEM, \* p < 0,05 versus Reperfusionsbedingungen -ATP.

Wurde in den ersten 30 Minuten der 60-minütigen Reperfusion ATP appliziert, stieg die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, verglichen mit Reperfusionsbedingungen ohne ATP (-ATP), auf deutlich höhere Werte an. Entzog man diesen so behandelten Zellen das ATP, glich sich deren zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration rasch wieder an die der Kontrollgruppe (-ATP) an, und der zeitliche Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel beider Versuchsreihen unterschied sich bis zum Ende der Experimente nicht mehr voneinander.



Die Auswertung der Lückenbildung unter diesen Bedingungen zeigt die nächste Grafik.

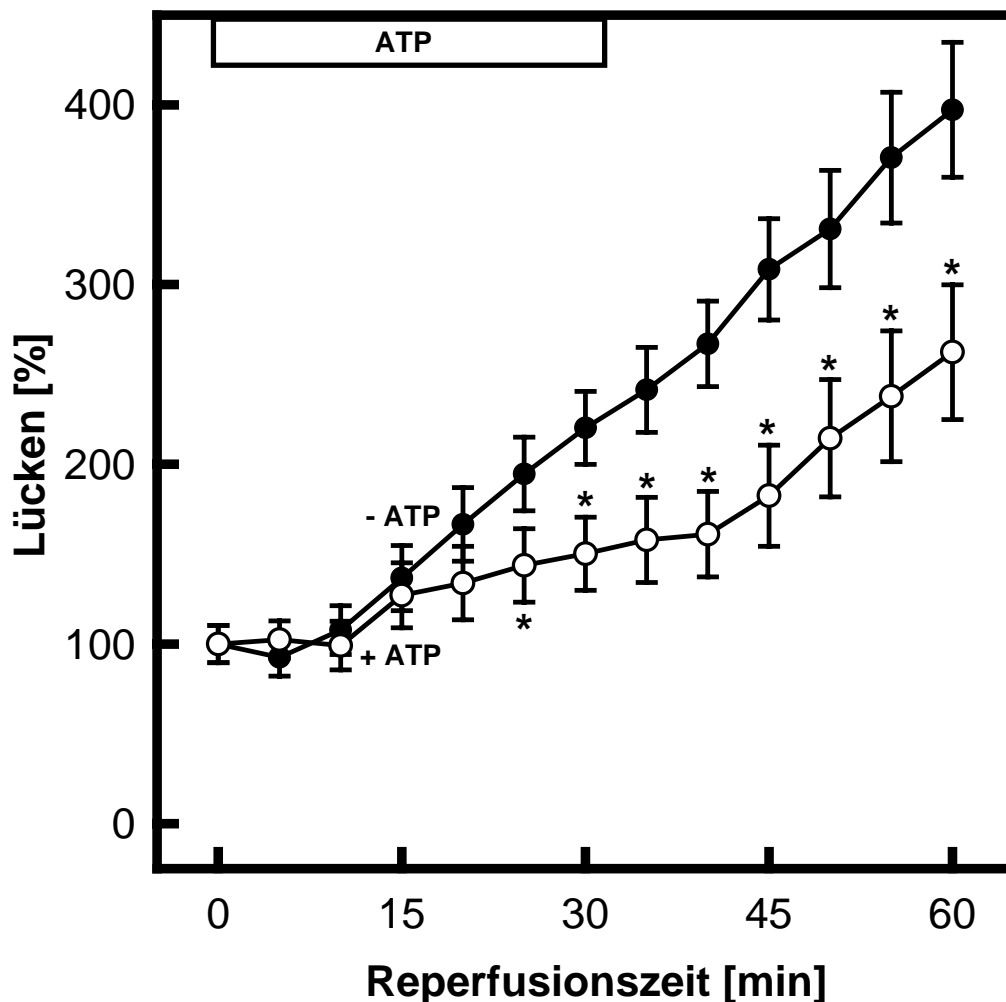


Abbildung 4.1.6b zeigt den Verlauf der Lückenbildung in der Reperfusion bei Reperusionsbedingungen ohne ATP (-ATP, n = 6) und unter Applikation von ATP (+ATP, n = 10) während der ersten 30 Minuten der Reperfusion. Dargestellt als Prozentwerte  $\pm$  SEM, bezogen auf die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde, \*  $p < 0,05$  versus Reperusionsbedingungen -ATP.

Die Lückenbildung war in den ersten 30 Minuten der Reperfusion bei den mit ATP behandelten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe ohne ATP (-ATP) deutlich reduziert. In der Auswaschphase stieg bei den protektionierten Zellen die Geschwindigkeit der Lückenbildung wieder an. Das Ausmaß der Lückenbildung

blieb nach zeitweiliger ATP-Gabe aber dauerhaft niedriger als in der Kontrollgruppe (-ATP). Die ATP-behandelten Zellen wiesen nach 60 Minuten Reperfusion  $262\% \pm 38\%$  Lücken auf, während die Lücken der Kontrollgruppe auf  $397\% \pm 50\%$  angewachsen waren (verglichen mit 100 % am Ende der Anoxie).

Die durch Einfluss von extrazellulärem ATP erreichte Protektion vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung hält also über den Zeitraum der Applikation hinaus an.

## **4.2 Ischämie-Reperfusionsversuche am isolierten Herz**

Um zu überprüfen, ob die gegen reperfusionsinduzierte Lückenbildung schützende Wirkung von extrazellulärem ATP auch am intakten Koronarsystem von Relevanz ist, führten wir Ischämie-Reperfusionsexperimente mit isolierten Herzen durch. Wie bereits im experimentellen Protokoll (Kapitel 3.2) beschrieben, wurden hierzu die Herzen männlicher 200 - 300 g schwerer Wistar Ratten im Langendorff-Modus perfundiert und Ischämie und Reperfusion ausgesetzt.

#### 4.2.1 Die Wirkung von ATP auf die reperfusionsinduzierte Ödementwicklung in isolierten Herzen

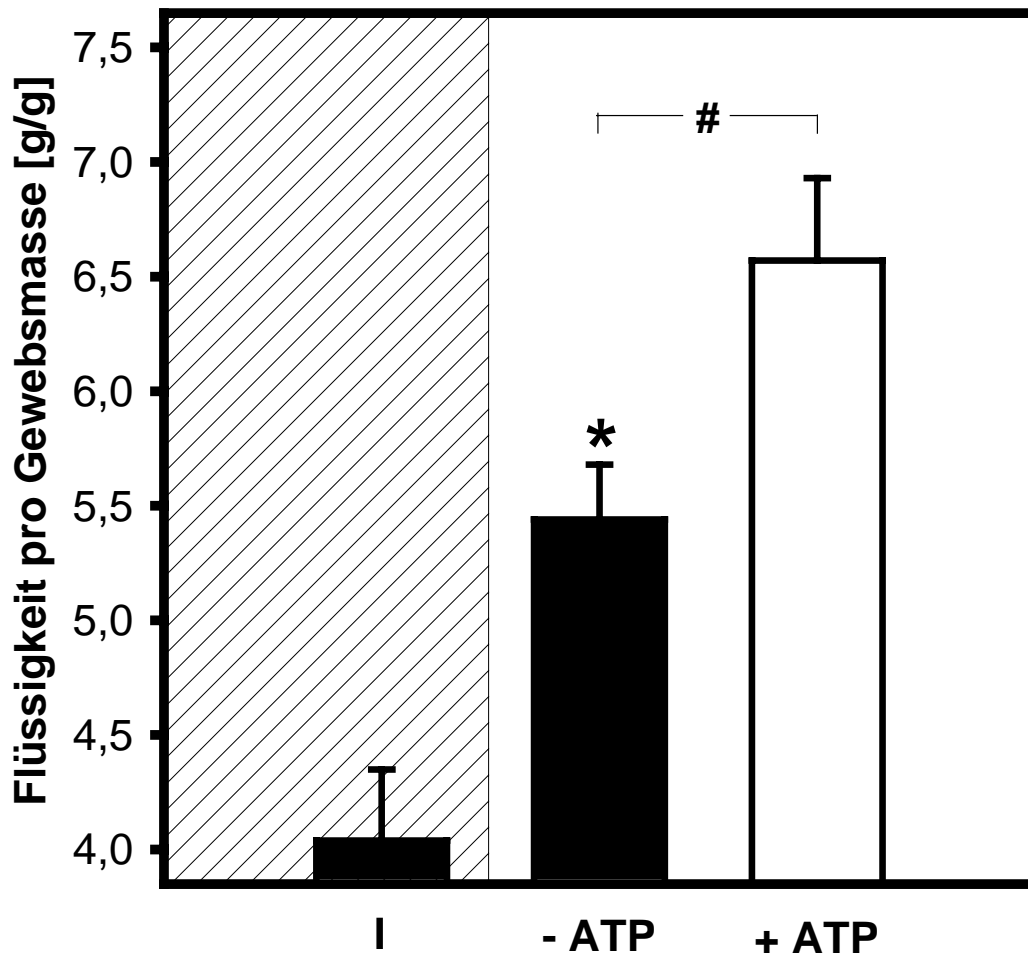


Abbildung 4.2.1a zeigt den Anteil des Wassers im Herzgewebe bezogen auf das Gewicht der getrockneten Herzen. Die Herzen wurden entweder einer 90-minütigen No-Flow-Ischämie (I) ausgesetzt oder nach einer 60-minütigen No-Flow-Ischämie mit ATP (+ATP) oder ohne ATP (-ATP) 30 min reperfundiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$  versus I, #  $p < 0,05$  versus Reperfusionsbedingungen -ATP.

Die Ergebnisse zeigen, dass extrazellulär verabreichtes ATP die reperfusionsbedingte Ödematisierung verglichen mit Reperfusionsbedingungen ohne ATP (-ATP) verstärkt. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Versuche an endothelialen Monolayern, wo extrazelluläres ATP einen Schutz vor der reperfusionsinduzierten Lückenbildung vermittelte.

Um auch den Einfluss der Abbauprodukte von ATP auf dessen Wirkung am reperfundierten Herzen beurteilen zu können, wurden die Herzen während der Reperfusion zusätzlich zu ATP mit 10  $\mu$ M des Adenosinrezeptorblockers 8-Phenyltheophyllin oder mit 100  $\mu$ M ARL 67156, einem Ektonucleotidasehemmer, perfundiert.

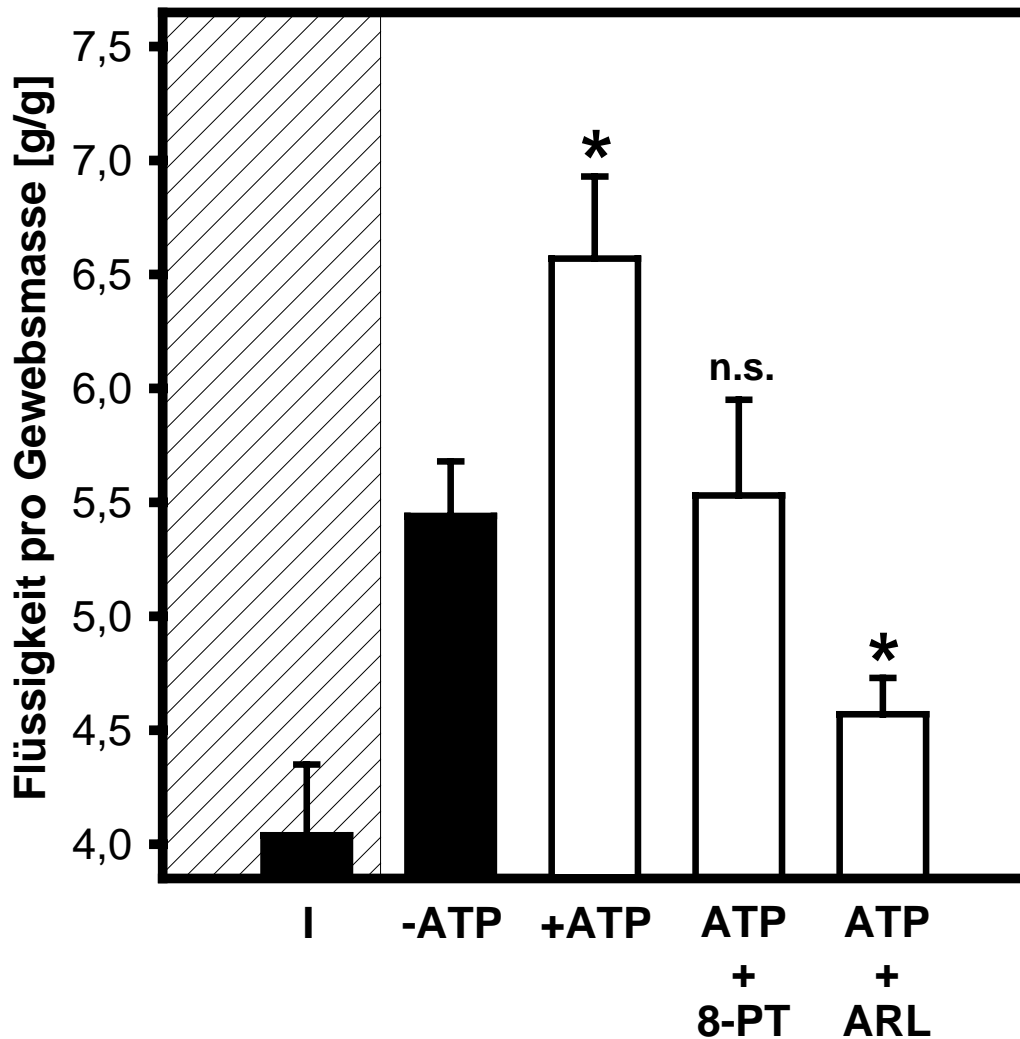


Abbildung 4.2.1b zeigt den Anteil des Wassers im Herzgewebe bezogen auf das Gewicht der getrockneten Herzen. Die Herzen wurden entweder einer 90-minütigen No-Flow-Ischämie (I) ausgesetzt oder nach einer 60-minütigen No-Flow-Ischämie ohne ATP (-ATP), mit ATP (+ATP), mit ATP und 8-PT (ATP + 8-PT) oder mit ATP und ARL (ATP + ARL) 30 min reperfundiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$  versus Reperfusionsbedingungen -ATP; n.s., nicht signifikant versus Reperfusionsbedingungen -ATP.

Die Ergebnisse mit 8-PT (ATP + 8-PT) zeigen, dass die Verstärkung der reperfusionsinduzierten Ödematisierung durch ATP in diesem Modell auf die Wirkung des Abbauproduktes Adenosin zurückgeführt werden kann. Bei gleichzeitiger Applikation von ARL und ATP (ATP + ARL) konnte die reperfusionsinduzierte Ödementwicklung deutlich reduziert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ATP die Ödementwicklung in der Reperfusion wirksam vermindert wenn sein Abbau gehemmt wird.

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen,

- 1.) dass extrazelluläres ATP die reperfusionsinduzierte Lückenbildung in Endothelzellschichten und die reperfusionsinduzierte Ödementstehung in isoliert perfundierten Herzen reduziert,
- 2.) dass diese Protektion unabhängig von Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist,
- 3.) dass diese Wirkung über eine Beeinflussung der MLK-Phosphorylierung erreicht wird, und
- 4.) dass diese Effekte nicht durch den ATP-Metaboliten Adenosin bedingt sind.

### **5.2 Endotheliale Monolayer unter simulierten Ischämie-Reperfusionsbedingungen**

#### **5.2.1 Charakterisierung der Calciumüberladung in Endothelzellen unter simulierten Ischämie- und Reperfusionsbedingungen**

Wie in Kapitel 4.1.1 dargestellt, kommt es während der simulierten Ischämie zu einem zytosolischen Calciumanstieg in den Endothelzellen. Dieser hat während der Anoxie einen charakteristischen zweiphasigen Verlauf. Der initiale Anstieg ist auf eine Inositol-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) - vermittelte Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen (Ladilov et al. 2000, Schäfer et al. 2001). Er wird durch das Absinken der intrazellulären

ATP-Konzentration ausgelöst. Sinkt diese nur um 30 %, steigt bereits die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an (Noll et al. 1995, Schäfer et al. 2001). Die Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher triggert einen langsameren Calciumeinstrom von extrazellulär, einen so genannten kapazitativen Calciumeinstrom (Putney 1990, Dolor et al. 1992, Schäfer et al. 2001). Nach der 40-minütigen simulierten Ischämie setzt sich diese Calciumüberladung in der Reperusionsphase fort. Die cytosolische Calciumüberladung während Ischämie und Reperfusion ist pathophysiologisch von Bedeutung, da durch diese eine Reihe strukturschädigender Mechanismen aktiviert werden, die eine dauerhafte Funktionseinschränkung der Zellen zur Folge haben (Curry FE 1992, Furchgott et al. 1993).

### **5.2.2 Charakterisierung der interzellulären Lückenbildung in Endothelzellmonolayern bei simulierter Ischämie- und Reperfusion**

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Energieversorgung der Zelle die interzelluläre Lückenbildung, und damit die Permeabilität, über eine Aktivitätsveränderung des endothelialen kontraktiven Apparates beeinflusst (Watanabe et al. 1991, Noll et al. 1995). Das phosphorylierende Enzym (MLKK) ist in seiner Aktivität von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig (Sheldon et al. 1993, Goeckeler et al. 1995, Garcia et al. 1997, Verin et al. 1998) und führt über eine Aktivierung des kontraktiven Apparates zur Entstehung von Interzellularspalten (Wysolmerski et al. 1991, Noll et al. 1995, Schäfer et al. 2003). Im koronaren Strombett können durch die entstandenen Interzellularspalten Wasser, Makromoleküle und andere osmotisch wirksame Teilchen in den Extravasalraum gelangen. Ein kardiales Ödem ist die Folge (al-Haboubi et al. 1995, Di Napoli et al. 2001). Die Interzellularspaltenbildung kann durch Hemmstoffe der Aktin-Myosin-Interaktion, durch Hemmung der MLKK und durch PP1/2A-Aktivierung verhindert werden (Sheldon et al. 1993, Noll et al. 1999, Watanabe et al. 1996, Schäfer et al. 2003). Die durch simulierte Ischämie von 40 Minuten Dauer induzierte Interzellularspaltenbildung nimmt in der Reperusionsphase weiter zu. Frühere

Arbeiten zeigten, dass auch die reperfusionsinduzierte Lückenbildung auf eine Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates zurückzuführen ist: durch eine Hemmung der MLKK konnte die reperfusionsinduzierte Lückenbildung am Koronarendothel verhindert werden (Schäfer et al. 2003).

## **5.3 Fragestellung**

### **5.3.1 Die Wirkungen von extrazellulärem ATP auf Endothelzellen**

Im Zentrum dieser Arbeit stand der Versuch mit extrazellulär appliziertem ATP die reperfusionsinduzierte endotheliale Lückenbildung zu vermindern.

Es war zuvor gezeigt worden, dass extrazelluläres ATP die MLK-Phosphorylierung über eine Aktivierung Calyculin-A-sensitiver Proteinphosphatasen (PP1/2A) reduziert (Noll et al. 2000) und dass es die Permeabilität von Endothelzellmonolayern verringert (Noll et al. 1999).

Sowohl an isolierten Gefäßen als auch an kultivierten Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung purinerger Rezeptoren zu einer IP<sub>3</sub>-vermittelten Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern (Motte et al 1995, Tanaka et al. 2004) und zu einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum führt (Yamamoto et al. 2000, Ramirez et al. 2002). Trotz der Induktion dieses Calciumanstiegs reduziert die extrazelluläre ATP-Applikation die Permeabilität von Endothelzellmonolayern (Noll et al. 1999).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass dieser Effekt auch unter Reperfusionsbedingungen zu beobachten ist. Extrazellulär appliziertes ATP führte in den Versuchen an Endothelzellmonolayern zu einem initialen, transienten Calciumanstieg und zu einer erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Konzentration während der gesamten untersuchten Reperfusionsphase. Dennoch reduzierte es die interzelluläre Lückenbildung (Abb. 4.1.2a/b). Frühere Arbeiten an Endothelzellmonolayern haben gezeigt, dass die calciumabhängige interzelluläre Lückenbildung in der Reperfusionsphase einer Sättigung unterliegt und bereits bei Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen die nach einer 40-minütigen Anoxie erreicht werden



maximal induziert ist (Schäfer et al. 2003). Eine Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über dieses Niveau, wie es bei ATP-Applikation zu beobachten ist, hat aufgrund dieser Sättigungscharakteristik keinen verstärkenden Einfluß auf die Lückenbildung.

Die Versuche mit BAPTA, einem intrazellulär wirkenden Calciumchelator, zeigen, dass eine Reduzierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Reperfusion auf präanoxisches Niveau die Lückenbildung in gleichem Maße verhindert wie ATP-Applikation, da die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige MLK-Aktivierung vermindert wird. Die Absenkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit BAPTA während der ATP-Applikation hatte keinen Einfluß auf die ATP-vermittelte Protektion vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung (Abb. 4.1.3a/b).

Extrazelluläres ATP in der verwendeten Konzentration macht also den zur Lückenbildung führenden Mechanismus in der Reperfusion unwirksam. Diese Wirkung von extrazellulärem ATP scheint calciumunabhängig zu sein, da Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während ATP-Applikation keinen Einfluß auf den protektiven Effekt hatten.

Dies lässt vermuten, dass ATP den endothelialen kontraktilen Apparat auf einem calciumunabhängigen Weg so stark inhibiert, dass die durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-vermittelte Aktivierung der MLKK im untersuchten Endothelzellmodell wirkungslos bleibt. Die Untersuchungen zur Bestimmung der MLK-Phosphorylierung unter Ischämie-Reperfusionsbedingungen  $\pm$  ATP bestätigen diese Hypothese insoweit, daß ATP-Applikation zu einer ausgeprägten Dephosphorylierung der Myosinleichtketten führte. ATP verhinderte dabei nicht nur die reperfusionsinduzierte MLK-Phosphorylierung sondern senkte den Phosphorylierungsgrad während der Reperfusion sogar unter den präanoxischen Ausgangswert (Abb 4.1.4). Die Ergebnisse früherer Arbeiten deuten darauf hin, dass dieser Effekt auf eine Aktivierung Calyculin-A-sensitiver Proteinphosphatasen (PP1/2A) zurückzuführen ist (Noll et al. 1999 & 2000, Schäfer et al. 2003).

### **5.3.2 Reversibilität der ATP-Effekte**

Um zu klären, ob die durch ATP-Applikation vermittelte Protektion dauerhaft ist oder bei Wirkstoffentzug aufgehoben wird, wurden zusätzlich Experimente durchgeführt bei denen das extrazelluläre ATP nach der 30-minütigen Reperfusion weitere 30 Minuten lang ausgewaschen wurde. Es zeigte sich, daß die ATP-induzierte Calciumerhöhung vollständig reversibel ist (Abb. 4.1.6a), die Protektion vor Lückenbildung, innerhalb der Versuchsdauer, aber nicht (Abb. 4.1.6b).

### **5.3.3 Der ATP-Metabolit Adenosin und sein Einfluß auf die beobachteten Effekte in den untersuchten Modellen**

Gelangt ATP in das extrazelluläre Medium, beispielsweise durch Freisetzung aus dem Intrazellularraum unter Stressbedingungen oder durch exogene Applikation, wird es von Ekto-Enzymen rasch zu Adenosin abgebaut. Hierbei sind Ekto-Apyrasen für den Abbau von ATP zu ADP und 5'-AMP verantwortlich. Der Abbau von 5'-AMP zu Adenosin wird durch die Ekto-5'-Nukleotidase katalysiert (Pearson et al. 1980, Berra-Romani 2004). Adenosin selber ist ein hochaffiner Agonist an purinergen P1- oder Adenosinrezeptoren. Deshalb wurde in einem weiteren Set von Experimenten untersucht, ob die beobachtete protektive Wirkung von extrazellulärem ATP über purinerge P2-Rezeptoren oder Adenosinrezeptoren vermittelt wird. Die Ergebnisse zeigen, daß die Applikation des P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin die protektive Wirkung von ATP neutralisiert, die Blockade der Adenosinrezeptoren mit 8-PT während der ATP-Gabe jedoch keinen Einfluß auf die Lückenbildung hat (Abb 4.1.5). Dies zeigt, daß der ATP-vermittelte Schutz vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung durch purinerge P2-Rezeptoren vermittelt wird. Die Wirkungslosigkeit der Adenosinrezeptorblockade auf die Lückenbildung zeigt, dass der Abbau von ATP zu Adenosin in diesem Versuchsmodell keine bedeutende Rolle spielt. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass im Modell der superfundierten endothelialen Monolayer die

ATP-Metabolite durch die kontinuierliche Perfusion rasch abtransportiert und die extrazelluläre ATP-Konzentration konstant auf Überschußniveau gehalten wird.

Ungeklärt blieb, ob die Metabolisierung von ATP im intakten Koronarsystem von Bedeutung ist, da im Modell isoliert perfundierter Herzen die Endothelzelloberfläche bezogen auf das Perfusatvolumen größer ist als im Modell der endothelialen Monolayer. Das bedeutet, dass eine Einheit appliziertes ATP bei seiner Passage durch das Koronarsystem mit einer größeren Menge von Ektoenzymen in Kontakt kommt und nicht ausgeschlossen werden kann, dass dabei erhebliche Mengen ATP abgebaut werden.

## **5.4 Simulierte Ischämie und Reperfusion am intakten Koronarsystem**

Die Versuche an Endothelzellmonolayern zeigen, dass extrazelluläres ATP den reperfusionsinduzierten Barrierschaden auf zellulärer Ebene wirkungsvoll und nachhaltig verhindert. Um zu überprüfen, ob extrazelluläres ATP auch am intakten Koronarsystem wirksam gegen die reperfusionsinduzierte Barriestörung ist, wurden Ischämie-Reperfusions-Versuche am isolierten Herzen durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigten allerdings, daß extrazellulär appliziertes ATP die reperfusionsinduzierte Ödematisierung verstärkt (Abb. 4.2.1a). Dies ist am ehesten auf die oben (Kap. 5.3.3) skizzierte Metabolisierung von extrazellulärem ATP und die permeabilisierende Wirkung von Adenosin auf mikrovaskuläre Koronarendothelien zurückzuführen (Watanabe et al. 1992). In weiteren Versuchen wurden die Adenosinrezeptoren mit 8-PT blockiert oder der ATP-Abbau durch Ektonukleotidasen mit ARL 67156 gehemmt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß die Hemmung des ATP-Abbaus während der ATP-Applikation die reperfusionsinduzierte Ödementwicklung gegenüber Kontrollbedingungen deutlich reduziert. Die Blockade der Adenosinrezeptoren mit 8-PT senkt die reperfusionsinduzierte Ödematisierung auf Kontrollniveau (Abb. 4.2.1b). Das zeigt, dass extrazelluläres ATP die reperfusionsinduzierte Ödementwicklung am isolierten Herzen reduziert, wenn man seinen Abbau

hemmt und damit die permeabilisierende Wirkung des ATP-Metaboliten Adenosin verhindert.

## **5.5 Schlussfolgerung**

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die purinerge Aktivierung von Endothelzellen durch extrazellulär appliziertes ATP den reperfusionsinduzierten Barrierschaden an Endothelzellmonolayern und im intakten Koronarsystem wirkungsvoll und nachhaltig verhindert. Dies lässt die Aktivierung der durch ATP angesprochenen Signalvermittlung als therapeutisches Prinzip zur Behandlung und Prophylaxe des reperfusionsinduzierten Ödems vielversprechend erscheinen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war zu klären,

- 1) ob extrazelluläres ATP die reperfusionsinduzierte Lückenbildung in Endothelzellschichten und die reperfusionsinduzierte Ödementstehung in isoliert perfundierten Herzen reduzieren kann,
- 2) ob eine Beeinflussung der reperfusionsinduzierten Lückenbildung von der intrazellulären Calciumhomöostase abhängig ist,
- 3) ob extrazelluläres ATP den endothelialen kontraktilen Apparat durch Modulierung der MLK-Phosphorylierung beeinflusst und
- 4) ob diese Effekte durch den Abbau von ATP zu Adenosin und dadurch bedingte Eigeneffekte von Adenosin beeinflusst werden.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen:

- 1) Extrazelluläres ATP verhindert die reperfusionsinduzierte Lückenbildung bei kultivierten mikrovaskulären Endothelzellmonolayern und reduziert die reperfusionsinduzierte Ödematierung an isolierten Herzen.
- 2) Die von ATP vermittelte Protektion ist unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.
- 3) Extrazelluläres ATP wirkt direkt auf den endothelialen kontraktilen Apparat und reduziert die Phosphorylierung der Myosinleichtketten.
- 4) Diese protektive Wirkung von ATP ist über purinerge P2-Rezeptoren vermittelt und nicht durch den ATP-Metaboliten Adenosin bedingt.

## 6 SUMMARY

The aim of the present study was to determine,

- 1) if extracellular ATP can abolish reoxygenation-induced gap formation in endothelial monolayers and the reperfusion-induced swelling of isolated perfused hearts,
- 2) if this effect on reperfusion-induced gap-formation depends on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration,
- 3) if extracellular ATP influences the endothelial contractile apparatus by modulation of myosin-light-chain phosphorylation,
- 4) if these effects are influenced by degradation of ATP due to effects of the ATP metabolite adenosine.

The major findings of this study are:

- 1) Extracellular ATP abolishes reoxygenation-induced increase in intercellular gap formation in endothelial monolayers and reduces reperfusion-induced swelling of isolated hearts.
- 2) This ATP-mediated effect is independent of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration.
- 3) Extracellularly applied ATP directly influences the contractile endothelial apparatus by dephosphorylation of myosin-light-chains.
- 4) This protective effect of ATP is mediated by purinergic P2-receptors and not caused by adenosine, a metabolite of ATP.

## 7 LITERATUR

**al-Haboubi HA, Tomlinson DR, Ward BJ.**

The influence of hypoxia on transvascular leakage in the isolated rat heart: quantitative and ultrastructural studies.

J Physiol. 1995 Jan 1;482 ( Pt 1):157-66.

**Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KSR, Cobbold PH.**

Cytosolic free calcium in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation.

Biochem J. 1987 Jun 1;244(2):381-5.

**Apstein CS, Deckelbaum L, Mueller M, Hagopian L, Hood WB Jr.**

Graded global ischemia and reperfusion. Cardiac function and lactate metabolism.

Circulation. 1977 Jun;55(6):864-72

**Bassenge E.**

Modulation of coronary tone: the role of the endothelium

G Ital Cardiol. 1990 Nov;20(11):1062-9. Related Articles, Links

**Berra-Romani R, Rinaldi C, Raqeeb A, Castelli L, Magistretti J, Taglietti V, Tanzi F.**

The duration and amplitude of the plateau phase of ATP- and ADP-evoked Ca(2+) signals are modulated by ectonucleotidases in in situ endothelial cells of rat aorta.

J Vasc Res. 2004 Mar-Apr;41(2):166-73. Epub 2004 Mar 03.

**Bodin P, Bailey D, Burnstock G.**

Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells.

Br J Pharmacol. 1991 May;103(1):1203-5.

**Busse R, Fleming I, Hecker M.**

Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation.

Eur Heart J. 1993 Nov;14 Suppl I:2-9.

**Busse R, Fleming I.**

Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation.

Ann Med. 1995 Jun;27(3):331-40.

**Curry FE.**

Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells.

FASEB J 6: 2456–2466,1992.

**Dagenais F, Cartier R, Hollmann C, Buluran J.**

Calcium-channel blockers preserve coronary endothelial reactivity after ischemia-reperfusion.

Ann Thorac Surg 1997; 63:1050-1056

**Davies PF, Mundel T, Barbee KA.**

A mechanism for heterogeneous endothelial responses to flow in vivo and in vitro.

J Biomech. 1995 Dec;28(12):1553-60.

**Di Napoli P, Antonio Taccardi A, Grilli A, Spina R, Felaco M, Barsotti A, De Caterina R.**

Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts.

Cardiovasc Res. 2001 Aug 1;51(2):283-93

**Dolor RJ, Hurwitz LM, Mirza Z, Strauss HC, Whorton AR.**

Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool.

Am J Physiol. 1992 Jan;262(1 Pt 1):C171-81.



**Fleming I, Bauersachs J, Busse R.**

Paracrine functions of the coronary vascular endothelium.

Mol Cell Biochem. 1996 Apr 12-26;157(1-2):137-45.

**Furchgott RF and Vanhoutte PM.**

Endothelium-derived relaxing and contracting factors.

FASEB J 3: 2007–2018, 1993.

**Garcia JG, Schaphorst KL, Shi S, Verin AD, Hart CM, Callahan KS, Patterson CE.**

Mechanismus of ionomycin-induced endothelial cell barrier dysfunction.

Am J Physiol 1997; 273:1172-84

**Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY.**

A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties.

J Biol Chem 1985;260:3440-3450.

**Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, Rodewald CW, Schäfer M, Pfitzer G, Piper HM, Noll T.**

ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability.

Cardiovasc Res. 2003 Aug 1;59(2):470-8.

**Inauen W, Payne DK, Kvietys PR, Granger DN.**

Hypoxia/reoxygenation increases the permeability of endothelial cell monolayers: role of oxygen radicals.

Free Radic Biol Med. 1990;9(3):219-23.

**Kupatt C, Weber C, Wolf DA, Becker BF, Smith TW, Kelly RA.**

Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFκB.

J Mol Cell Cardiol. 1997 Oct;29(10):2599-609.

**Ladilov Y, Schäfer C, Held A, Schäfer M, Noll T, Piper HM.**

Mechanism of Ca(2+) overload in endothelial cells exposed to simulated ischemia.

Cardiovasc Res. 2000 Aug;47(2):394-403

**Li Q, Altschuld RA, Stokes BT.**

Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios.

Biochem Biophys Res Commun. 1987 Aug 31;147(1):120-6.

**Ludbrook J.**

Advantages of permutation (randomization) tests in clinical and experimental pharmacology and physiology.

Clin Exp Pharmacol Physiol. 1994 Sep;21(9):673-86.

**Moccia F, Berra-Romani R, Baruffi S, Spaggiari S, Signorelli S, Castelli L, Magistretti J, Taglietti V, Tanzi F.**

Ca<sup>2+</sup> uptake by the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in rat microvascular endothelial cells.

Biochem J. 2002 May 15;364(Pt 1):235-44.

**Motte S, Communi D, Pirotton S, Boeynaems JM.**

Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells.

Int J Biochem Cell Biol. 1995 Jan;27(1):1-7.

**Muhs A, Noll T, and Piper HM.**

Vinculin phosphorylation and barrier failure of coronary endothelial monolayers under energy depletion.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 273: H608–H617,1997.

**Newby AC, Henderson AH.**

Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells.

Annu Rev Physiol. 1990;52:661-74.

**Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM.**

Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers.

Am J Physiol 1995;268:H1462–1470.

**Noll T, Hölschermann H, Koprek K, Gündüz D, Haberbosch W, Tillmanns H, Piper HM.**

ATP reduces macromolecule permeability of endothelial monolayers despite increasing  $[Ca^{2+}]_i$ .

Am J Physiol. 1999 Jun;276(6 Pt 2):H1892-901.

**Noll T, Schäfer M, Schavier-Schmitz U, Piper HM.**

ATP induces dephosphorylation of myosin light chain in endothelial cells.

Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Sep;279(3):C717-23.

**Oike, M., C. Kimura, T. Koyama, M. Yoshikawa, and Y. Ito.**

Hypotonic stress-induced dual  $Ca^{2+}$ -responses in bovine aortic endothelial cells.

Am. J. Physiol. 2000; 279:H630–H638.

**Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL.**

Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture.

Biochem J. 1980 Aug 15;190(2):421-9.

**Persechini A, Kamm KE, Stull JT.**

Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth muscle.

J Biol Chem. 1986 May 15;261(14):6293-9.

**Piper HM, Spahr R, Mertens S, Krützfeld A, Watanabe H.**

Micovascular endothelial cells from heart.

In: Piper HM, editor, Cell culture techniques in heart and vessel research, Heidelberg: Springer, 1990, pp. 158-177.

**Putney JW Jr.**

Capacitative calcium entry revisited.

Cell Calcium. 1990 Nov-Dec;11(10):611-24.

**Ramirez AN, Kunze DL.**

P2X purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Jun;282(6):H2106-16.

**Schäfer M, Bahde D, Bosche B, Ladilov Y, Schäfer C, Piper HM, Noll T.**

Modulation of early  $[Ca^{2+}]_i$  rise in metabolically inhibited endothelial cells by xestospongins.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Mar;280(3):H1002-10.

**Schäfer C, Walther S, Schäfer M, Dieterich L, Kasseckert S, Abdallah Y, Piper HM.**

Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation.

Cardiovasc Res. 2003 Apr 1;58(1):149-55.

**Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn.**

Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium.

J Physiol. 1990 Dec;431:379-401.

**Schwiebert LM, Rice WC, Kudlow BA, Taylor AL, Schwiebert EM.**

Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells.

Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Feb;282(2):C289-301.

**Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S, Shasby DM.**

Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction.

Am J Physiol. 1993 Dec;265(6 Pt 1):L606-12.

**Tanaka N, Kawasaki K, Nejime N, Kubota Y, Nakamura K, Kunitomo M, Takahashi K, Hashimoto M, Shinozuka K.**

P2Y receptor-mediated Ca(2+) signaling increases human vascular endothelial cell permeability.

J Pharmacol Sci. 2004 Jun;95(2):174-80

**Verin AD, Gilbert-McClain LI, Patterson CE, and Garcia JG.**

Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 19: 767-776, 1998.

**Watanabe H, Kuhne W, Spahr R, Schwartz P, Piper HM.**

Macromolecule permeability of coronary and aortic endothelial monolayers under energy depletion.

Am J Physiol. 1991 Apr;260(4 Pt 2):H1344-52.

**Watanabe H, Kuhne W, Schwartz P, Piper HM.**

A2-adenosine receptor stimulation increases macromolecule permeability of coronary endothelial cells.

Am J Physiol. 1992 Apr;262(4 Pt 2):H1174-81.

**Watanabe H, Takahashi R, Zhang XX, Kakizawa H, Hayashi H, Ohno R.**

Inhibition of agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry in endothelial cells by myosin light-chain kinase inhibitor.

Biochem Biophys Res Commun. 1996 Aug 23;225(3):777-84.

**Wysolmerski RB, Lagunoff D.**

Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jan;87(1):16-20.

**Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Qi Z, Sokabe M, Ando J.**

P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 Jul;279(1):H285-92.

**Yamamoto K, Sokabe T, Ohura N, Nakatsuka H, Kamiya A, Ando J.**

Endogenously released ATP mediates shear stress-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx into pulmonary artery endothelial cells.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Aug;285(2):H793-803. Epub 2003 Apr 24.

## **8 ERKLÄRUNG**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

(Sascha Andreas Kasseckert)

## **9 DANKSAGUNG**

Herrn Professor Dr. Dr. H. M. Piper danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes innerhalb des Physiologischen Institutes, für die gute Betreuung und die hilfreiche Kritik die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Claudia Schäfer und Herrn Dr. Matthias Schäfer danke ich für die intensive Unterstützung und die nette Betreuung dieser Arbeit und für ihre wertvollen Anregungen.

Für die hervorragende technische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Daniela Schreiber, Herrn Hermann Holzträger und Herrn Peter Volk bedanken.

Den Mitarbeitern der institutseigenen Werkstatt, insbesondere Herrn Günther Schade und Herrn Otto Becker, danke ich für die tatkräftige Unterstützung.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Institutes und besonders des Calciumlabors.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Karen, die mich mit allen Mitteln unterstützt hat und mir immer hilfsbereit zur Seite stand.



## 10 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name:	Sascha Andreas Kasseckert
Geburtsdatum:	15. Dezember 1974
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch

### Schulbildung

08.1981 - 07.1985	Besuch der Grundschule Leihgestern.
08.1985 - 07.1991	Besuch der Gesamtschule Großen-Linden.
08.1991 - 06.1994	Besuch der Liebigschule Gießen mit Abschluss Abitur. (Prüfungsfächer Physik, Mathematik, Deutsch, Geschichte.)

### Zivildienst

08.1994 - 10.1995	Zivildienst im Bereich der individuellen Schwerbehindertenbetreuung.
-------------------	---

### Studium

10.1995 - 09.1996	Studium der Physik an der Universität Gießen. Ohne Abschluss.
-------------------	--

10.1996 - 03.2002	Studium der Humanmedizin an der Universität Gießen.
10.2001 - 04.2003	Doktorarbeit am Physiologischen Institut der Universität Gießen.
05.2002 - 04.2003	Forschungstätigkeit am Physiologischen Institut als studentische Hilfskraft bzw. ab 12.2002 als Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs 534 "Biologische Grundlagen der vaskulären Medizin".
04.2003 - 03.2004	Praktisches Jahr. Davon Innere Medizin und Anästhesie am Universitätsklinikum und Chirurgie am Evangelischen Krankenhaus, beides Gießen.
05.2004	Abschluss des Medizinstudiums mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Mai 2004.
06.2004 -	Tätigkeit im Rahmen der Promotionsarbeit.

**Kenntnisse**

Sprachen	Englischkenntnisse, Latinum.
EDV	MS Office, Jandel Sigmaplot, Adobe Photoshop, Kenntnisse und Erfahrung in der Administration kleiner Netzwerke und in der Betriebssystemwartung (MS Windows 2000 Professional, MS Windows XP Professional)

**Veröffentlichungen, Vorträge und Poster**

Schäfer C, Walther S, Schäfer M, Dieterich L, Kasseckert S, Abdallah Y, Piper HM.

Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation.

Cardiovasc Res. 2003 Apr 1;58(1):149-55. PMID: 12667956

Ladilov Y, Efe O, Schäfer C, Rother B, Kasseckert S, Abdallah Y, Meuter K, Dieter Schlüter K, Piper HM.

Reoxygenation-induced rigor-type contracture.

J Mol Cell Cardiol. 2003 Dec;35(12):1481-90. PMID: 14654374

Y Abdallah, A Gkatzoflia, H Pieper, E Zoga, S Walther, S Kasseckert, M Schäfer, KD Schlüter, HM Piper and C Schäfer.

Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury.

Cardiovasc Res. 2005 Apr 1;66(1):123-31.

S.A. Kasseckert, M. Schäfer, L. Dieterich, C. Schäfer.

ATP reduziert die reperfusionsinduzierte Barrierenstörung des Koronarendothels.

82. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, März 2003, Bochum, Poster *und*

69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz - und Kreislaufforschung, April 2003, Mannheim, Vortrag V477

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN 3-8359-5022-3



®